

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LES ODEURS DÉGAGÉES PAR LES BACTÉRIES ANAÉROBIES

I. — *INFLABILIS LACUSTRIS*

par A.-R. PRÉVOT et A. SARRAF (*).

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies)

INTRODUCTION.

Parmi les quelques caractères des bactéries qui frappent d'emblée les sens de l'observateur, deux ont particulièrement retenu l'attention : leurs couleurs et leurs odeurs. Mais, alors que les pigments sont facilement définissables par un nom précis de teinte, obtenu par comparaison optique avec les teintes étalons des codes internationaux (ce qui revient à une mesure indirecte de longueur d'onde), les odeurs bactériennes sont pratiquement indéfinissables. On en est réduit à user de comparatifs, tels que odeur de « fromage fermenté », odeur de « dent cariée », odeur « fécaloïde », etc. ou de superlatifs très vagues tels que âcre < désagréable < fétide < putride. Mais l'odeur fétide de *F. fusiformis* est toute différente de celle de *Cl. corallinum*, de même que l'odeur putride de *Cl. sporogenes* est toute différente de celle de *Cl. sordellii* et il n'existe aucune méthode de mesure et de dénomination exacte des odeurs.

Or, on sait depuis les travaux d'Armand Gautier, de Barger, de Dale, de Guggenheim [1] que l'odeur dégagée par une culture bactérienne est rarement due à une seule substance odorante, mais

(*) Manuscrit reçu le 10 juin 1960.

à un mélange parfois très complexe de catabolites malodorants ou fétides : SH_2 , indole, scatol, mercaptans, thioesters, amines de décarboxylation volatiles ou fixes. On pourrait se demander pourquoi l'odeur de chaque espèce bactérienne n'est pas définie depuis longtemps par l'énumération des substances odorantes qu'elle produit. Il suffit d'examiner les techniques anciennes de caractérisation de ces substances pour en trouver la raison : longues, difficiles, onéreuses, imprécises et non spécifiques, telles sont les causes de leur emploi exclusif par quelques rares organiciens et le fait qu'elles ne sont pas entrées dans la pratique courante. Au contraire, tout pouvait être résolu par la chromatographie sur papier et l'électrophorèse. C'est ainsi que la chromatographie du groupe principal de substances bactériennes malodorantes, les amines de décarboxylation, a été étudiée par Bremmer et Kenten en 1951 [2] et par Schwyzer en 1952 [3], que l'électrophorèse a été mise au point par Blass, Machebœuf et Rebeyrotte en 1953 [4], que la chromatographie suivie d'électrophorèse a été réalisée par Blass, Lecomte et Polonovski en 1954 [5], que leur séparation par chromatographie de partage et leur détermination par électrophorèse sur papier a été faite par Herbst, Keister et Weaver en 1958 [6].

Enfin Blass et Sarraf en 1960 [7] ont mis au point une technique nouvelle simplifiée qui permet de séparer, de caractériser et de doser les amines volatiles, après leur séparation du bouillon de culture par distillation alcaline et les amines fixes dans le résidu de cette distillation, en utilisant la chromatographie sur papier et l'électrophorèse.

Avant d'exposer les résultats obtenus par Sarraf en 1960 [8] avec *Inflabilis lacustris*, nous exposerons la technique de Blass et Sarraf.

TECHNIQUE.

A. *Electrophorèse sur papier.*

L'appareil de Machebœuf, Rebeyrotte et Dubert et les grands bacs de Leres ont été utilisés sous 400 volts, pendant un temps variable suivant la nature du tampon (deux à six heures). Ces grands bacs qu'on peut brancher à raison de deux ou plus à la fois sur l'appareil, permettent d'utiliser des feuilles de 40 cm de longueur sur 29 cm de largeur.

La séparation des bases aminées a été réalisée dans les tampons suivants :

Tampon de pH 2,4 : acide acétique N.

Tampon de pH 4 : phthalate acide de potassium 0,1 N, 100 ml ; NaOH 0,1 N, 8 ml ; eau q. s. pour compléter à 200 ml.

Tampon de pH 4 : acide sulfosalicylique 0,05 M ; on amène à pH 4 par addition de soude.

Tampon de pH 8,6 : véronal acide, 1,84 g ; véronal sodique, 10,3 g ; eau q. s. pour compléter à 1 000 ml.

Tampon de pH 10,0 : ammoniacque 0,065 N (7 ml d'ammoniacque pur 22° dans 1 l d'eau).

Seul le tampon de pH 10,0 (ammoniacque 0,065 N) avec du papier Whatman 3, pendant quatre heures, a permis de séparer à partir du bouillon 4 amines fixes : la tyramine, l'histamine, la putrescine et la cadavérine ; les autres tampons n'ont pas donné de résultat satisfaisant.

On dépose les gouttes du bouillon sur une ligne distante de 8 cm du point médian, c'est-à-dire à 12 cm de l'extrémité anodique de la feuille. Les amines migrent vers la cathode beaucoup plus loin que les protides et les acides aminés.

Les gouttes à analyser sont déposées avec des micropipettes graduées 5, 10, 15 mm³ ; on sèche ces gouttes sur le papier avec un séchoir électrique après chaque 5 mm³ pour que le diamètre de ces gouttes ne dépasse pas 5 mm ; on installe la feuille sur le chevalet médian de l'appareil tout en laissant ses deux extrémités tremper suffisamment dans le tampon, puis on l'humecte délicatement et complètement avec ce même tampon à l'aide d'une pipette de 10 ml, en prenant soin particulièrement de laisser le tampon goutte à goutte et loin des taches séchées du bouillon. On attend que ces taches soient mouillées par capillarité et on branche l'appareil.

Après écoulement du temps voulu, le papier est séché à l'étuve à 100° puis révélé par pulvérisation d'une solution de ninhydrine (tricéthohydrindène) à 0,1 p. 100 dans du butanol saturé d'eau, additionné de 1 p. 100 d'acide acétique, puis remis à l'étuve pendant quelques minutes pour obtenir des colorations violettes, bleues ou gris-violet suivant la nature de l'amine.

A côté du révélateur général des amines primaires et secondaires qui est la ninhydrine, nous avons utilisé des révélateurs spécifiques tels que :

1° Le réactif de Pauly, formule de Dent, qui colore la tache de tyramine sur le papier d'électrophorèse en rouge-orangé et l'histamine en rose foncé ; on le prépare de la façon suivante : on mélange 5 cm³ d'une solution d'acide sulfanilique à 1 p. 100 dans l'acide chlorhydrique N refroidi à 0° dans la glace avec 0,5 cm³ d'une solution aqueuse de nitrite de sodium à 5 p. 100 et 40 cm³ d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 6,5 p. 100. On prépare ce mélange juste avant l'usage et on le pulvérise immédiatement sur le papier d'électrophorèse séché. Les taches colorées apparaissent à l'instant et sont stables pendant longtemps.

2° Le réactif d'Ehrlich, formule de Smith donne une coloration pourpre avec la tryptamine ; c'est une solution à 1 p. 100 de p-diméthylaminobenzaldéhyde dans un mélange de 90 cm³ d'acétone et de 10 cm³ d'acide chlorhydrique pur.

On prépare ce réactif et on le pulvérise immédiatement sur le papier d'électrophorèse séché ; la tache pourpre de la tryptamine apparaît en deux minutes à la température du laboratoire.

3° Le réactif de Sakaguchi, formule de Roche, donne une coloration rose (fleur de pêcher) avec l'agmatine ; on pulvérise successivement sur le papier séché :

a) Une solution renfermant 0,2 cm³ NaOH à 40 p. 100 ; 0,2 cm³ de solution alcoolique d' α -naphтол à 1 p. 100 ; 0,2 cm³ de solution aqueuse d'urée à 40 p. 100 et 10 cm³ de n-butanol.

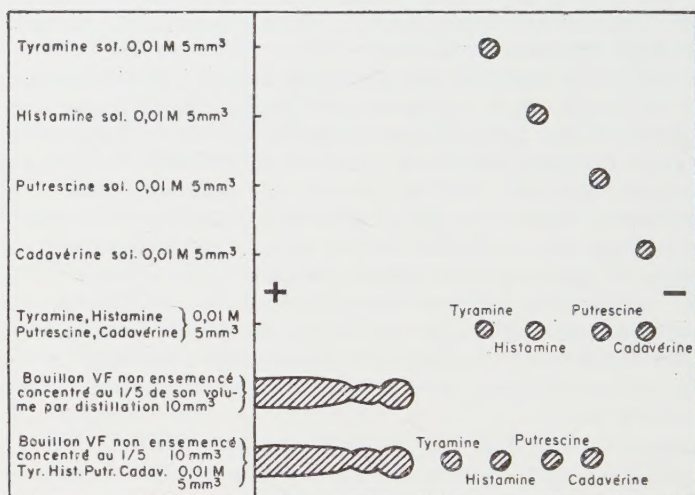


FIG. 1. — Electrophorèse 400 volts, durée cinq heures, papier Whatman 3, pH 10,0, révélation ninhydrine acétique.

b) Une solution de BrONa provenant de la dilution au cinquième de celle obtenue par l'addition de 0,9 cm³ de brome à 100 cm³ de NaOH à 10 p. 100.

La coloration des taches n'est stable qu'à condition d'employer des solutions finement pulvérisées et d'opérer la dessiccation rapide et complète à froid après la pulvérisation de chacun des deux réactifs.

4° Le réactif de Chargaff pour la révélation des amines tertiaires qui ne se révèlent pas avec la ninhydrine ; il donne sur le papier des taches bleu foncé sur un fond bleu clair ; on révèle avec ce réactif de la façon suivante :

a) On pulvérise une solution aqueuse d'acide phosphomolybdique à 2 p. 100 sur le papier.

b) On lave par immersion dans le butanol pendant cinq minutes.

c) On lave dans l'eau courante pendant cinq minutes.

d) On plonge ensuite dans une solution de chlorure stanneux à 0,4 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 3 N.

Les taches bleu foncé apparaissent immédiatement sur un fond clair.

La mobilité d'une amine, c'est-à-dire la distance parcourue par ce corps sur le papier à électrophorèse, dépend de la nature de l'amine, du pH du tampon, de la durée de l'électrophorèse ; mais il faut noter qu'elle n'est pas la même si cette amine est en solution

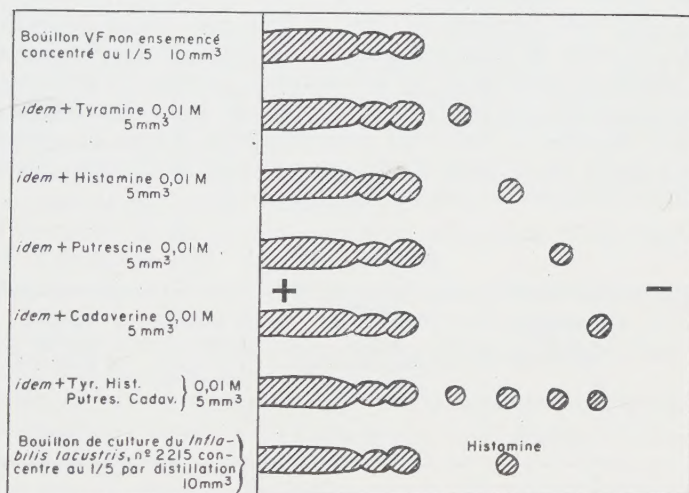


FIG. 2. — Electrophorèse 400 volts, durée cinq heures, papier Whatman 3, pH 10,0, révélation ninhydrine acétique.

pure ou en présence d'excès d'autres substances. Nous avons remarqué qu'elle diminue si l'amine est en présence du bouillon (voir fig. 1).

Pour rechercher la mobilité des amines dans le bouillon, la technique des témoins latéraux a été utilisée ; sur le papier à électrophorèse est mis successivement, le bouillon pur non ensemencé qui ne contient pas initialement d'amines et le bouillon additionné des différentes amines témoins. Au point n° 7 (fig. 2) nous avons mis 10 mm³ d'un bouillon ensemencé avec une souche d'*Inflabilis lacustris* ; nous avons trouvé ainsi dans ce bouillon un corps qui donne une tache qui correspond à celle de l'histamine.

Pour s'assurer que ce corps est bien l'histamine, il faut faire

une nouvelle électrophorèse et la révéler avec le révélateur spécifique de l'histamine qui est le réactif de Pauly ; puis faire une troisième électrophorèse avec des témoins internes, c'est-à-dire déposer sur le papier au-dessus de la goutte de bouillon l'histamine pure comme témoin interne pour voir si elle migre avec le corps trouvé et si l'ensemble donne une seule tache. On fait encore une autre électrophorèse après hydrolyse préalable du bouillon pour éliminer les taches dues aux peptides ; enfin il faut éluer ce corps et faire avec cet éluat de nouvelles électrophorèses avec différents tampons ainsi que des chromatographies et des chromatophorèses afin de dresser la courbe d'absorption au spectrophotomètre avec un réactif approprié.

Pour avoir des résultats valables, il faut que chaque expérience d'électrophorèse, de chromatographie ou de chromatophorèse soit accompagnée et contrôlée par des témoins internes et latéraux.

Le tableau I qui indique les chemins parcourus en centimètres par les bases aminées en solutions aqueuses sous forme de chlorhydrates à partir de la ligne de départ au cours de l'électrophorèse dans divers tampons sur papier Whatman n° 3.

TABLEAU I.

	: Tampon : pH 8,6 : Durée 2h30 :	: Tampon : pH 4,0 : Acide : sulfosalicylique : Durée 2h30 :	: Tampon : pH 4,0 : Fhtalate : Durée 2h :	: Tampon : pH 10,0 : Durée 4 h :
Agmatine	: 22,5	: 15,4	: 16,0	: 15,2
Cadavérine	: 23,5	: 17,2	: 17,6	: 15,0
Histamine	: 16,0	: 16,2	: 17,1	: 9,0
Putrescine	: 24,3	: 18,7	: 18,9	: 12,6
Tryptamine	: 12,6	: 11,4	: 8,9	: 8,3
Tyramine	: 14,4	: 12,3	: 10,2	: 6,0
Ethanolamine	: 20,8	: 17,9	: 16,5	: 18,5
Glucosamine	: 9,0	: 12,7	: 8,5	: 3,9
Arginine	: 12,4	: 11,4	: 8,3	: 5,4
Lysine	: 13,4	: 12,4	: 10,2	: 4,7

A titre de comparaison nous avons fait figurer dans ce tableau deux amines : glucosamine, éthanolamine et les acides aminés basiques : lysine, arginine.

Nous avons effectué également l'électrophorèse de la neurine $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{N}(\text{CH}_3)_2 \text{OH}$ dans le tampon à pH 4 ; nous avons révélé les taches de ces deux corps avec le révélateur de Chargaff cité plus haut ; en une heure trente, les chemins parcourus étaient 14,6 cm pour la neurine et 13,4 cm pour la choline.

B. Chromatographie sur papier.

Nous avons étudié la séparation des amines fixes par la chromatographie ascendante et descendante dans le solvant butanol acide acétique, eau 125 : 30 : 125, formule de Woïwood. On laisse migrer le solvant jusqu'au bord de la feuille, on la sèche à l'étuve à 100°, ensuite on la développe avec la ninhydrine acétique ou avec un révélateur spécifique approprié comme indiqué précédemment pour l'électrophorèse sur papier.

Voici des RF de ces amines en solutions pures sous forme de chlorhydrate sur papier Whatman 3 ;

Putrescine : 0,12. Cadavérine : 0,15. Histamine : 0,15. Agmatine : 0,18. Tyramine : 0,61. Tryptamine : 0,66.

Pratiquement si on chromatographie un mélange de ces 6 amines on obtient 2 grosses taches ; la première est formée par la putrescine, la cadavérine, l'histamine et l'agmatine, et la deuxième par la tyramine et la tryptamine.

Voici les RF de quelques amino-acides déposés sur le même chromatogramme : Lysine : 0,13. Arginine : 0,17. Alanine : 0,32. Tyrosine : 0,43. Phénylalanine : 0,58.

De ce qui précède, on déduit que la chromatographie seule ne permet pas d'identifier les amines dans un bouillon de culture puisqu'il contient des acides aminés et des peptides qui ont des RF très voisins des RF des amines ; elle ne permet pas non plus, en l'absence d'acides-amino, la résolution complète d'un mélange de bases aminées.

C. Chromatoionophorèse.

Pour la chromatoionophorèse, une feuille de papier Whatman n° 3 de 57 × 46,5 cm est utilisée. On effectue dans la première dimension une électrophorèse sur papier, le sens du courant étant perpendiculaire au sens d'écoulement du solvant.

On dispose la solution à analyser en O (voir fig. 3) à 7 cm de la ligne médiane MN, vers le bord qui sera plongé dans le compartiment anodique et à 11 cm du bord AB. On trace les lignes EF et GH suivant la largeur de l'appareil à électrophorèse qui doit recevoir ces bandes (soit 32 cm de largeur maximum KL dans les essais).

Le solvant utilisé pour la chromatographie est le mélange butanol acide acétique-eau 125 : 30 : 125 phase supérieure ; on met la

FIG. 3.

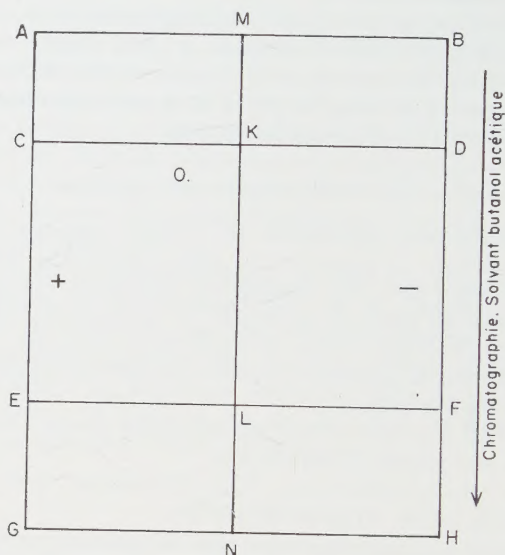
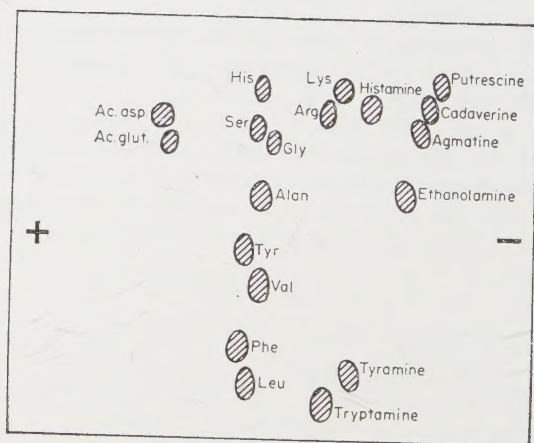


FIG. 4.



phase inférieure dans un petit Becher pour saturer l'atmosphère du bac de chromatographie.

On laisse migrer le solvant généralement vingt-quatre heures jusqu'à ce qu'il commence à s'écouler du papier ; on sèche alors

le papier dans une étuve à 100° pour chasser les dernières traces d'acide acétique.

La bande CDEF découpée est placée dans l'appareil à électrophorèse en utilisant un des tampons cités plus haut, les tampons pH 8,6 ou 10,0 de préférence, et en mouillant le papier comme indiqué dans le chapitre de l'électrophorèse.

La révélation peut être faite avec le révélateur général qui est la ninhydrine et les révélateurs cités plus haut.

Nous donnons (fig. 4) le schéma de séparation d'un mélange d'acides aminés et de bases aminées obtenues par la technique décrite plus haut en utilisant pour l'électrophorèse le tampon 8,6.

On voit sur le schéma que toutes les bases aminées analysées sont séparées entre elles, elles migrent beaucoup plus vite vers la cathode que les acides aminés basiques, neutres et acides ; ces acides aminés qui ont été déposés dans le même électrochromatogramme sont : leucine, phénylalanine, valine, tyrosine, alanine, glycine, sérine, histidine, lysine, arginine, acides aspartique et glutamique.

AMINES VOLATILES.

Les amines volatiles suivantes en solutions aqueuses 0,01 M de leurs chlorhydrates ont été séparées :

Amines primaires : méthylamine, éthylamine, propylamine, butylamine, isobutylamine, isoamylamine, phényléthylamine et allylamine.

Amines secondaires : diméthylamine, diéthylamine (en solution 0,1 M) et diisoamylamine.

Amines tertiaires : triméthylamine (en solution 0,2 M) et triéthylamine (en solution 0,02 M).

On dépose sur le papier 5 à 10 mm³ de ces solutions. Le distillat alcalin du bouillon à analyser qui est présumé contenir les amines volatiles est recueilli dans un récipient refroidi à 0° neutralisé par l'acide sulfurique en excès, avec la phénolphtaléine comme indicateur, puis évaporé à sec sur un bain-marie ; le résidu blanc qui est le sulfate des diverses amines volatiles présentes dans ce distillat est dissous dans 5 ml d'eau distillée ; ainsi ces amines volatiles sont assez concentrées pour permettre leur identification par la chromatographie et l'électrophorèse. On décele ainsi des quantités allant jusqu'à 2 µg. On révèle les amines primaires et secondaires avec une solution de ninhydrine à 0,1 p. 100 dans le butanol saturé d'eau additionnée de 1 p. 100 d'acide acétique par le même procédé de révélation cité plus haut pour les amines fixes ; mais en chauffant plus longtemps pour révéler les couleurs des amines secondaires, on obtient ainsi des colorations violettes, bleues ou rouges suivant la nature de l'amine.

Les amines tertiaires sont révélées par le réactif de Chargaff.

A. Chromatographie sur papier.

1° AMINES PRIMAIRES ET SECONDAIRES. — On peut séparer et identifier ces amines avec la chromatographie descendante sur le papier W 1 tamponné avec l'acétate de soude à 8,2 g par litre ; avec ce papier tamponné on empêche la formation des taches allongées et difficilement identifiables, on obtient ainsi des taches parfaitement rondes et denses ; pour tamponner le papier, on le plonge

TABLEAU II.

	R F	Révélation à la Ninhydrine Limite de sensibilité en µg	Coloration avec la Ninhydrine
Méthylamine	0,40	0,15	rouge - violette
Ethylamine	0,55	0,10	"
Propylamine	0,64	0,15	"
Isobutylamine	0,76	0,2	"
Butylamine	0,79	0,35	"
Isoamylamine	0,86	0,10	"
Allylamine	0,61	0,6	"
β- phényléthylamine	0,84	0,5	bleue
Diméthylamine	0,45	0,2	rosée
Diéthylamine	0,66	18	"
Diisocamylamine	0,95	30	"

dans la solution tampon et on le sèche immédiatement dans l'étuve à 100°. Le solvant est le mélange butanol — acide acétique — eau, 125 : 30 : 125 ; pour saturer l'atmosphère, on met la phase inférieure (aqueuse) dans un récipient à l'intérieur du bac de chromatographie.

Les solutions des amines obtenues par distillation des milieux de culture comme indiqué plus haut sont déposées sur le papier Whatman n° 1 tamponné en quantités variables entre 5 mm³ et

20 mm³ ; on ne doit pas déposer sur le papier plus de 5 mm³ à la fois pour ne pas avoir de taches d'un diamètre dépassant 0,5 cm ; les dépôts supérieurs forment sur le chromatogramme des taches trop diffuses ; il est préférable de sécher le papier avec un séchoir électrique après chaque application de 5 mm³.

On arrête la chromatographie quand le solvant migre jusqu'au bord inférieur du chromatogramme, le papier est ensuite séché à l'étuve à 100°, puis pulvérisé avec la ninhydrine acétique indiquée plus haut et remis à l'étuve de nouveau cinq à quinze minutes pour développer les couleurs.

On trouve dans le tableau II les RF des diverses amines étudiées

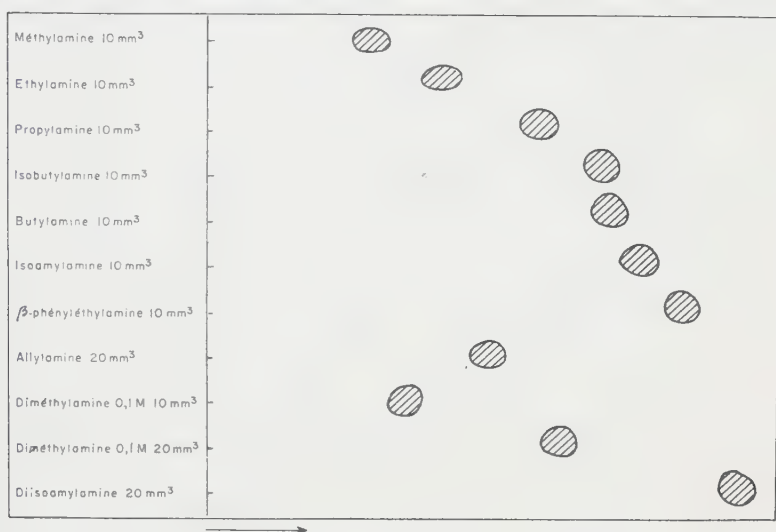


FIG. 5. — Chromatographie descendante, durée seize heures, papier Whatman 1 tamponné à l'acétate de soude 8,2 p. 1 000, révélation ninhydrine acétique. Solution = 0,01 M (sauf indication contraire).

avec la limite de sensibilité de la réaction à la ninhydrine ainsi que la teinte de la coloration obtenue.

On voit sur la figure 5 et le tableau II que les trois groupes d'amines suivantes ont des RF rapprochés et ne se séparent pas bien lorsqu'elles se trouvent mélangées : méthylamine et diméthylamine, butylamine et isobutylamine, propylamine et diéthylamine.

On peut séparer ces amines entre elles en utilisant une bande de papier de 80 cm (papier au mètre) tamponné avec l'acétate de soude comme indiqué ci-dessus, et en laissant la chromatographie se poursuivre pendant quarante à soixante-douze heures : chromatographie descendante à écoulement libre.

Ci-joint deux schémas : figure 6, une séparation incomplète de méthylamine, diméthylamine et éthylamine par une chromatographie descendante de vingt-quatre heures, et figure 7, une séparation

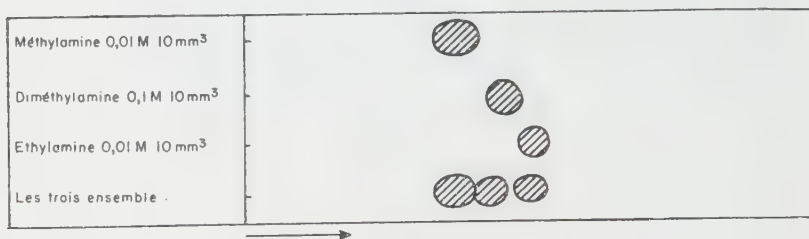


FIG. 6. — Chromatographie descendante, durée vingt-quatre heures, papier Whatman 1 tamponné, révélation ninhydrine acétique.

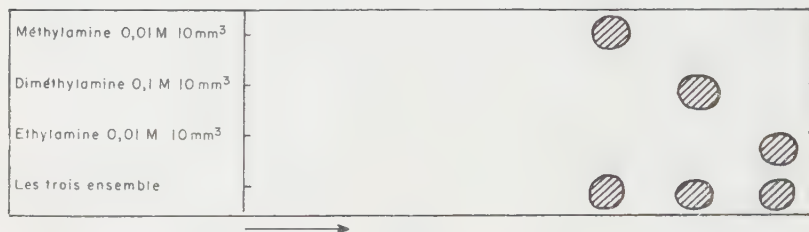


FIG. 7. — Chromatographie descendante continue, durée soixante-douze heures, papier Whatman 1, tamponné, révélation de Chargaff.



FIG. 8. — Chromatographie descendante, durée seize heures, papier Whatman 1 tamponné, révélation de Chargaff.

parfaite de ces trois amines par une chromatographie descendante continue de soixante-douze heures.

2° AMINES TERTIAIRES. — Les triméthylamine et triéthylamine chromatographiées dans les mêmes conditions que les amines

primaires et secondaires sur Whatman n° 1 tamponné avec le solvant butanol- acétique, mais révélées avec le révélateur de Chargaff puisqu'elles ne se révèlent pas avec la ninhydrine, ont les RF suivants :

Triméthylamine : 0,21 ; triéthylamine : 0,68.

A côté nous avons chromatographié deux corps révélables par le réactif de Chargaff, la choline et son amine de décarboxylation, la neurine ; leur RF sont : choline : 0,35 ; neurine : 0,41.

Le schéma de séparation de ces quatre corps est représenté dans la figure 8.

B. Electrophorèse sur papier.

1° AMINES PRIMAIRES ET SECONDAIRES. — L'électrophorèse est pratiquée comme pour les amines fixes sur papier Whatman n° 1 et

TABLEAU III.

	: : Chemins parcourus en : centimètres :
Méthylamine	: 19,5
Ethylamine	: 14,5
Propylamine	: 12,4
Butylamine	: 11,2
Isobutylamine	: 11,2
Iscamylamine	: 10,2
Allylamine	: 13,0
β - phényléthylamine	: 8,5
Diréthylamine	: 15,5
Diéthylamine	: 11,6
Diiscamylamine	: 7

révélée par la ninhydrine-acétique. Le tableau III indique en centimètres les distances parcourues par ces amines dans le tampon à pH 4 pendant une heure trente.

2° AMINES TERTIAIRES. — Le tableau IV indique les distances parcourues en centimètres par la triméthylamine et la triéthylamine avec la choline et la neurine dans le tampon de pH 4 à base de phthalate sur papier Whatman n° 1, ainsi que la limite de sensibilité avec le révélateur de Chargaff ; l'électrophorèse a été poursuivie pendant une heure et demie.

TABLEAU IV.

	: : Chemin parcouru : en cm	: : Révélateur de Chargaff : Limite de sensibilité en μ
Triméthylamine	: 16	: 60
Triéthylamine	: 11,7	: 9
Neurine	: 14,6	: 2,5
Choline	: 13,4	: 10

Les taches obtenues par électrophorèse sont moins étalées que celles obtenues par chromatographie, ce qui augmente la sensibilité de la révélation.

DOSAGE DES AMINES.

Divers procédés peuvent être appliqués pour l'évaluation quantitative des amines dans le bouillon de culture.

I. *Evaluation directe.*

Elle consiste à comparer visuellement l'intensité et l'ordre de grandeur des taches obtenues par électrophorèse et chromatographie avec des quantités croissantes de témoins. Ci-joint, figure 9, un exemple d'une souche d'*Inflabilis lacustris* n° 24/40B qui produit dans le bouillon de culture de l'histamine et de la tyramine ; puisque les solutions pures d'amines migrent plus loin que les amines accompagnées des protéines du bouillon de culture, on ajoute sur la feuille d'électrophorèse aux gouttes des solutions d'amines témoins, un bouillon non ensemencé qui ne doit contenir aucune trace d'amines.

Avec cette méthode on peut déterminer des quantités d'amines allant jusqu'à $\pm 2 \mu\text{g}$, ce qui donne une évaluation finale dans 1 l de bouillon de ± 20 p. 100 dans des conditions moyennes.

La figure 10 est le schéma d'une chromatographie d'amines volatiles trouvées dans le distillat du bouillon de culture d'une souche d'*Inflabilis lacustris* n° 08/7B qui produit la méthylamine, l'éthyla-

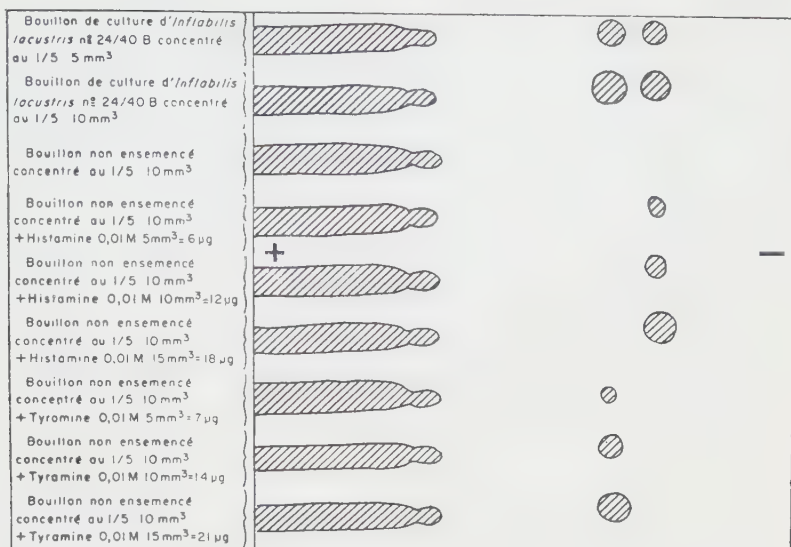


FIG. 9. — Electrophorèse 400 volts, durée cinq heures, tampon pH 10,0, papier Whatman 3, révélation par le réactif de Pauly.

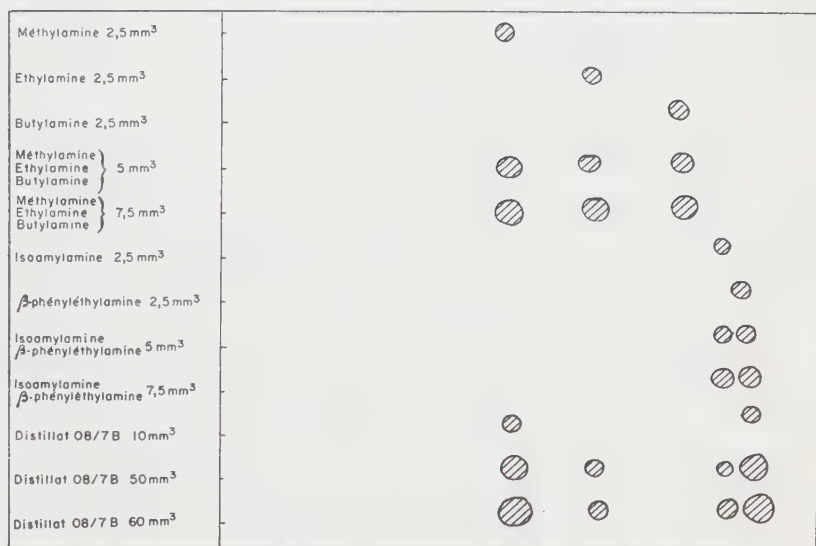


FIG. 10. — Chromatographie descendante. durée seize heures, papier Whatman n° 1 tamponné avec l'acétate de soude 8,2 p. 1 000, révélation ninhydrine acétique. Solution témoin 0,01 M.

mine, l'isoamylamine et la β -phényléthylamine ; nous avons placé à côté des quantités croissantes appropriées de témoins purs.

Ces amines se trouvent dans le bouillon de culture en quantités très inégales de sorte que quand nous n'avons déposé que 10 cm³ du distillat concentré au 1/200 de son volume, nous avons trouvé la méthylamine et la β -phényléthylamine et en déposant 40, 50 et 60 mm³ nous avons trouvé en plus l'éthylamine et l'isoamylamine.

En effet, dans 1 l de bouillon de culture de cette souche, il y avait 1,10 mg de méthylamine, 2,25 mg de β -phényléthylamine, 0,10 mg d'éthylamine et 0,21 mg d'isoamylamine.

En faisant varier les quantités déposées du distillat et des solutions témoins, on peut arriver à avoir des taches de la même intensité et du même ordre de grandeur jusque $\pm 1 \mu\text{g}$ et on calcule la quantité d'amine dans 1 l de bouillon avec une précision de ± 20 p. 100.

II. — Dosage spectrophotométrique après élution.

On fait éluer la partie du papier d'électrophorèse ou de chromatographie présumée contenir l'amine. Sur cet éluat, on fait agir un réactif approprié et on mesure sa densité optique au spectrophotomètre ; parallèlement on prépare une courbe de concentration de cette même amine rigoureusement dans les mêmes conditions et en reportant la densité optique de l'échantillon étudié sur cette courbe, on a quantitativement cette amine dans l'échantillon ; on calcule la quantité dans 1 l de bouillon.

ELUTION. — On fait une électrophorèse ou une chromatographie après avoir déposé plusieurs gouttes l'une à côté de l'autre de la solution étudiée, c'est-à-dire du bouillon ou du distillat, puis on révèle deux bandes étroites aux deux extrémités, supérieure et inférieure de ce papier pour localiser l'emplacement de l'amine ou des amines qu'on veut doser ; ensuite, on découpe la bande de papier qui contient des amines comme indiqué sur le schéma de la figure 11.

Ces bandes découpées peuvent être éluées par immersion dans l'eau distillée avec agitation mécanique ou mieux, on élue par capillarité en opérant de la manière suivante :

Dans un vase clos de chromatographie, on plonge dans l'eau distillée l'extrémité supérieure de cette bande découpée et on recueille de l'extrémité inférieure, l'eau qui tombe goutte à goutte par capillarité ; on laisse l'opération continuer pendant un à quatre jours et avant de l'arrêter on s'assure avec le réactif de Pauly pour l'histamine et la tyramine ou la ninhydrine pour les autres amines que l'eau qui s'écoule ne contient plus d'amines.

On peut doser la base aminée qui se trouve dans cet éluat par différents procédés :

1° Dosage de l'histamine et de la tyramine par le réactif de Pauly.

C'est la méthode citée par Frankel-Conrat et Singer pour l'histidine et la tyrosine. La solution à analyser est diluée à 2 ml, traitée par 0,2 ml d'acide sulfanilique à 1 p. 100 dans l'acide chlorhydrique N et par 0,2 ml de nitrite de sodium à 5 p. 100 ; après trente minutes à la température du laboratoire, on ajoute

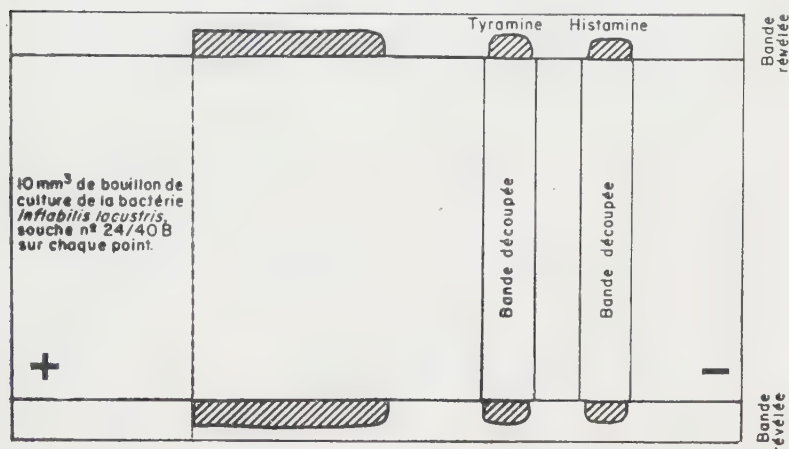


FIG. 11. — Electrophorèse 400 volts, tampon pH 10,0, durée six heures, papier Whatman n° 3, révélation par le réactif de Pauly.

5 ml d'une solution de carbonate de soude à 6,5 p. 100 pour le dosage de l'histamine et 2,5 ml de cette solution pour celui de la tyramine ; la lecture est faite au spectrophotomètre à 5100 Å après cinq minutes. Parallèlement on prépare avec des quantités de 2 à 30 µg de ces deux amines, une courbe de concentration (qui est droite) en diluant ces quantités dans 2 ml d'eau distillée et avec les mêmes réactifs dans les mêmes conditions.

Cette courbe de concentration est effectuée en portant en abscisses la densité optique indiquée par le spectrophotomètre et en ordonnées la concentration de l'amine dosée en µg ; on reporte sur cette courbe la densité optique de l'échantillon dosé qui doit contenir de 2 à 15 µg et on lit directement sa concentration.

Il convient de faire cette courbe de concentration avec chaque série de dosages en utilisant les mêmes lots de réactifs et d'eau distillée.

La précision est de $\pm 1 \mu\text{g}$, ce qui donne dans 1 l de bouillon de culture microbienne une précision finale de $\pm 5 \text{ p. } 100$. Ci-joint

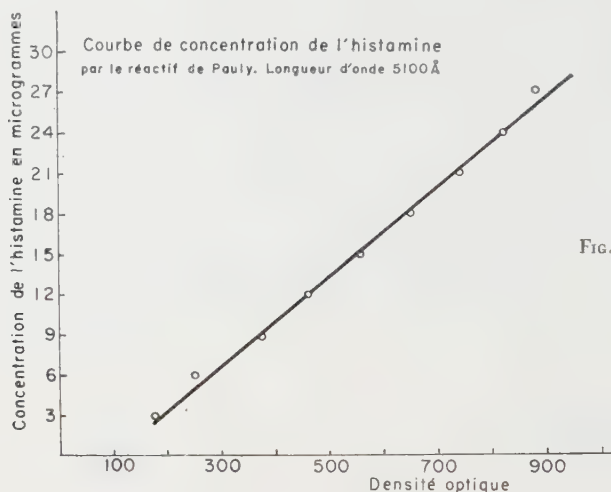


FIG. 12.

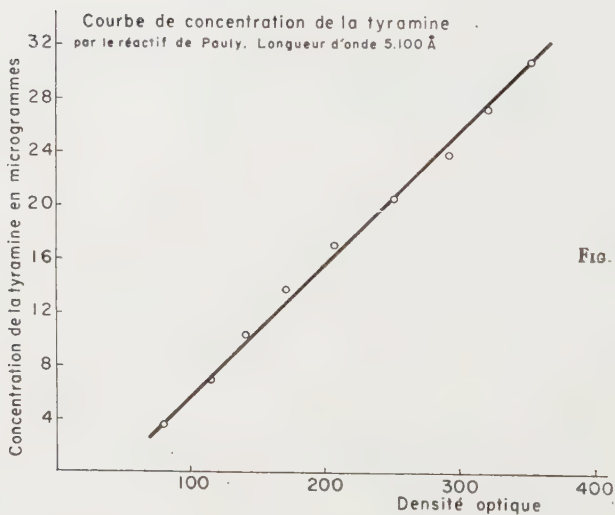


FIG. 13.

une courbe de concentration d'histamine (fig. 12) et de tyramine (fig. 13).

On peut aussi se servir de cette même réaction pour l'identification spectrophotométrique finale de l'histamine et de la tyra-

mine, après leur identification par chromatographie et électrophorèse, en traçant leurs courbes d'absorption, c'est-à-dire, la variation de leur densité optique avec la longueur d'onde du faisceau lumineux qui les traverse. On s'aperçoit dans la figure 14 que l'histamine a un double pic caractéristique à 3 800 Å et à 5 100 Å ; la tyramine n'a qu'un pic à 3 800 Å. Pour obtenir ces courbes d'absorption, il faut soustraire la densité optique du réactif seul, qui est très légèrement coloré, des densités optiques des solutions contenant l'histamine et la tyramine.

2° Dosage des amines par la ninhydrine-hydrindantine. Méthode

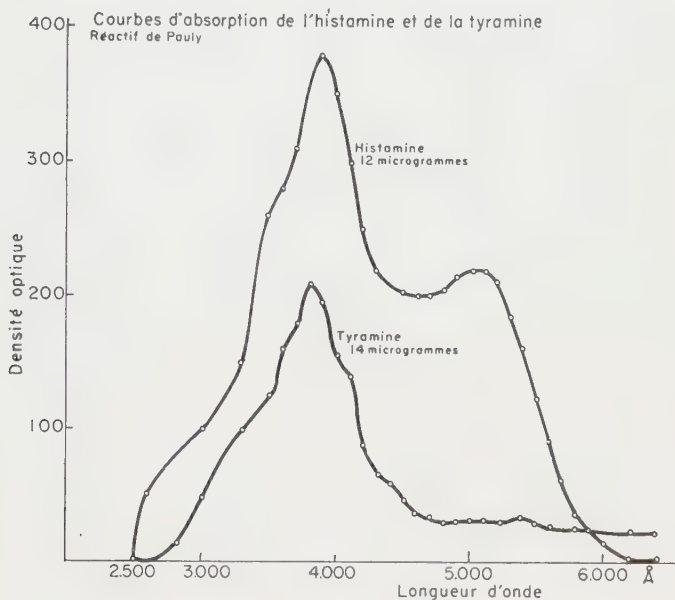


FIG. 14.

de Moore et Stein pour la détermination photométrique des acides aminés et leurs dérivés.

La solution du réactif est préparée avec les produits suivants :

a) Ninhydrine : pure.

b) Hydrindantine : on mélange en agitant une solution de 8 g de ninhydrine dissous dans 200 ml d'eau distillée à 90° avec une solution de 8 g d'acide ascorbique dissous dans 40 ml d'eau à 40° ; la cristallisation de l'hydrindantine commence immédiatement sans chauffage supplémentaire ; une demi-heure plus tard, le

produit obtenu est filtré et lavé avec l'eau, séché jusqu'au poids constant dans un dessiccateur protégé de la lumière sous vide, sur SO_4H_2 et KOH en pastilles, puis conservé dans une bouteille opaque.

c) *Tampon* pH : 5,5. Acétate de soude 4 N : on dissout 272 g d'acétate de soude dans 200 ml d'eau distillée en chauffant sur un bain-marie ; après refroidissement on ajoute 50 ml d'acide

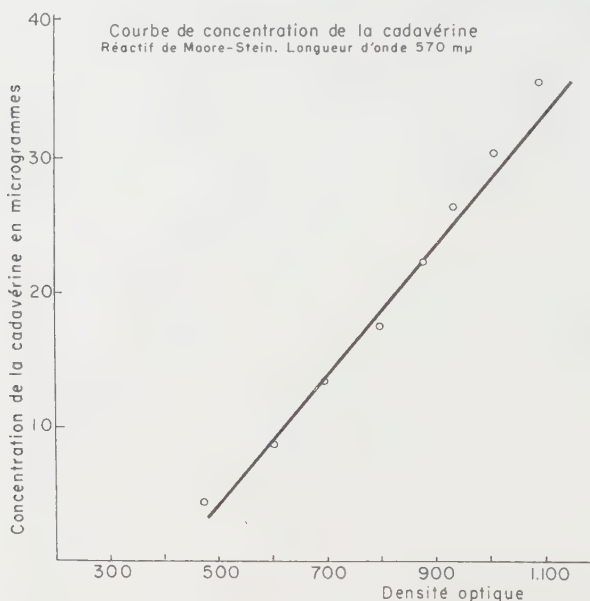


FIG. 15.

acétique glacial et on complète jusqu'à 500 ml ; la solution doit avoir un pH : 5,5.

d) Méthylcellosolve : redistillé pur.

Solution du réactif préparée extemporainement en dissolvant 0,1 g de ninhydrine, et 0,02 g d'hydrindantine dans 8,5 ml de méthylcellosolve et 3 ml de tampon pH 5,5 ; la solution rougeâtre obtenue est faite dans une bouteille opaque et utilisée tout de suite.

MODE OPÉRATOIRE. — La solution à analyser qui doit contenir de 5 à 15 μg d'une amine qui donne une coloration avec la ninhydrine est diluée à 2 ml, puis traitée par 1 ml de la solution

du réactif ; le tube est bouché, capuchonné, agité brièvement et chauffé dans un bain-marie bouillant couvert pendant quinze minutes ; après refroidissement rapide dans l'eau froide, la lecture est faite au spectrophotomètre sans ou après dilution avec une solution d'alcool éthylique-eau distillée 50 p. 100 suivant l'intensité de la coloration obtenue ; la lecture est faite à 5 700 Å.

Comme dans le dosage avec le réactif de Pauly, on fait une

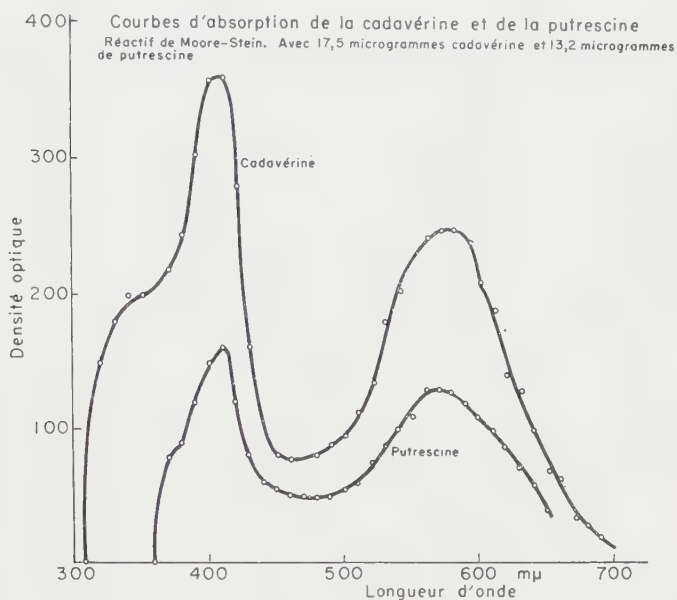


FIG. 16.

courbe de concentration avec des quantités régulièrement croissantes d'amines de 5 à 30 μg en portant en abscisses la densité optique et en ordonnées la concentration en microgrammes.

Les dosages avec cette méthode n'ont de valeur que si on fait simultanément et rigoureusement dans les mêmes conditions, une courbe de concentration avec chaque série de détermination, puisque des traces infimes d'ammoniaque ou de ses composés dans l'atmosphère ou dans l'eau changent considérablement la coloration obtenue. Ci-joint, fig. 15, la courbe de concentration de la cadavérine préparée avec des volumes de 0,25-2 ml d'une solution 0,0001 M, c'est-à-dire de 4,4-35 μg de cadavérine ; la précision est du même ordre qu'avec le réactif de Pauly : ± 5 p. 100.

La putrescine, la cadavérine, la méthylamine, l'éthylamine, la butylamine, l'isoamylamine, et la β -phényléthylamine ont toutes deux pics à 410 et 570 m μ , comme le montrent les figures 16 et 17.

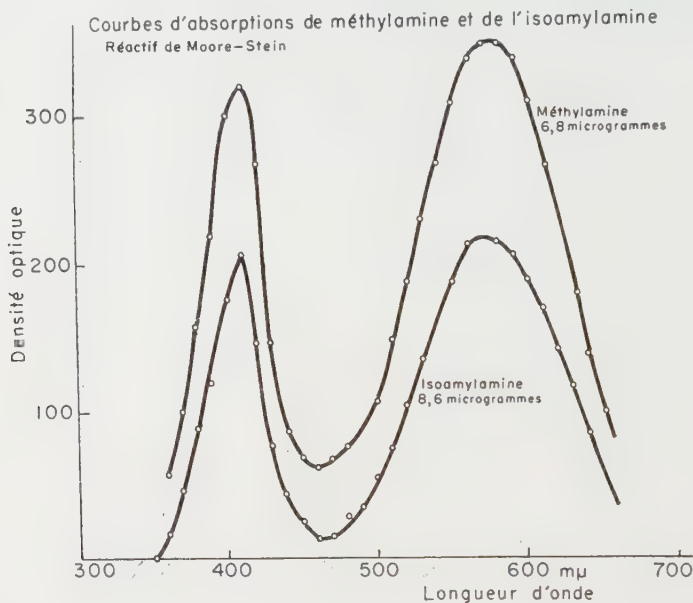


FIG. 17.

RÉSULTATS.

Inflabilis lacustris est un anaérobie isolé des boues lacustres du Ruwenzori (1) en 1956 par Prévot, Thouvenot, Petrigalla et Sillio [9]. Légèrement protéolytique et fortement gazogène, il dégage une odeur fétide très prononcée. Il est, de plus, le type de ces bactéries anaérobies ni toxigènes, ni hémolytiques, dont certaines souches tuent le cobaye par injection intramusculaire sans provoquer de lésions spécifiques. Comme nous supposons que son odeur était due aux amines fixes et volatiles que l'analyse sommaire de ses produits de fermentation du bouillon VF révélait comme particulièrement abondantes, nous avons voulu vérifier cette hypothèse sur les 15 souches de cette espèce

(1) Prélèvements faits par l'expédition H. de Heinzelin et H. Mollaret sous l'égide de l'Institut des Parcs Nationaux du Congo Belge.

conservées dans notre collection. Les extractions ont été faites sur des cultures âgées de 8 jours en bouillon VF glucosé. Les résultats sont résumés dans le tableau V, où la dernière colonne

TABLEAU V.

	Histamine	Tyramine	Putrescine	Cadavérine	Méthylamine	Ethylamine	Bétylamine	Bétylphényl - Etylamine	Isoamylamine	Survie en jours
24/40 B	200	800	-	-	-	0,2	-	8	1,3	2-6
968	150	120	150	175	-	0,4	-	6	-	5-12
1022 D	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	>15
17/44	125	175	-	-	-	-	-	3,1	-	10-15
2215	445	-	-	-	-	-	0,3	-	2,3	>15
12/16 C	-	-	-	-	2	-	-	-	10,5	5-10
06/43 D	-	-	-	-	0,6	-	0,5	4	3,7	>15
9143 C	-	-	-	-	-	-	0,7	-	4,3	>15
6/33 B	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5-10
6/33 C	-	110	-	-	+	-	+	-	+	3-8
15/39 K	-	-	-	-	+	+	+	-	-	>15
9143 B	135	72	-	-	-	+	+	-	-	3-10
12/16 B	185	150	-	-	-	-	+	+	-	>15
08/7 B	172	100	-	-	-	-	-	+	-	>15
17/63	-	-	-	-	-	-	-	-	+	>15

donne la survie en jours des cobayes inoculés, avec 5 cm³ de la culture par voie intrapéritonéale.

On voit que 7 souches produisent des quantités importantes

d'histamine et de tyramine ; toutes deux sont toxiques ; qu'une seule donne de la putrescine et de la cadavérine ; 5 donnent de la méthylamine, 4 donnent de l'éthylamine ; 7 de la butylamine ; 6 de la β -phényléthylamine ; 8 de l'isoamylamine. L'odeur de chaque souche diffère donc légèrement suivant la répartition de ces amines dont l'odeur s'ajoute à celle de quantités importantes d'indole et de scatol et de faibles quantités de SH_2 [10].

Chaque fois que cela a pu se faire, les amines ont été dosées. Les titres de chacune d'elles sont exprimés en milligrammes par litre de culture ; le tableau montre que la toxicité des souches est proportionnelle au pouvoir décarboxylant de chacune d'elles et à la production d'amines toxiques. Le problème de l'odeur des anaérobies sera donc définitivement résolu quand on aura appliqué la méthode décrite plus haut à chaque espèce.

CONCLUSIONS.

I. L'odeur dégagée par les bactéries en culture peut être caractérisée par l'énumération de chacune des substances malodorantes, dont la nature chimique est établie par chromatographie et électrophorèse.

II. L'odeur des cultures de *Inflabilis lacustris* est due à la somme indole, scatol, SH_2 , putrescine, cadavérine, méthylamine, éthylamine, butylamine, β -phényléthylamine et isoamylamine.

III. La toxicité des souches est proportionnelle à la quantité d'histamine et de tyramine qu'elles produisent.

SUMMARY

STUDIES ON THE SMELLS EMITTED BY ANAEROBIC BACTERIA.

I. — *Inflabilis lacustris*.

I. The smell emitted by anaerobic bacteria cultures can be characterized by the enumeration of each ill-smelling substance, the chemical nature of which is evidenced by chromatography and electrophoresis.

II. The smell of *Inflabilis lacustris* cultures is due to all of the following substances : indol, scatol, SH_2 , putrescin, cadaverin, methylamine, ethylamine, butylamine, β -phenylethylamine and isoamylamine.

III. The toxicity of a strain is proportional to the amount of histamin and tyramin it produces.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GUGGENHEIM (M.). *Les amines biologiques*. Edition française de A. Berthelot, A.-R. Prévot et C. Karl. Baillière, 1933.
 - [2] BREMMER (J.) et KENTEN (R. H.). *Biochem. J.*, 1951, **49**, 650.
 - [3] SCHWYZER (R.). *Acta Chem. Scand.*, 1952, **6**, 219.
 - [4] BLASS (J.), MACHEBOËUF (M.) et REBEYROTTE (P.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35**, 953.
 - [5] BLASS (J.), LECOMTE (O.) et POLONOWSKI (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36**, 627.
 - [6] HERBST (Av.), KEISTER (Et.) et WEAVER (R. H.). *Arch. Bioch. Bioph.*, 1958, **75**, 175.
 - [7] BLASS (J.) et SARRAF (A.). *J. Chromat.*, 1960, **3**, 168.
 - [8] SARRAF (A.). *Thèse de Pharmacie*. Paris, 1960.
 - [9] PRÉVOT (A.-R.), THOUVENOT (F.), PETRIGELLA (M.) et SILLIOC (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 929.
 - [10] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de détermination des Anaérobies*, 3^e édit., Masson, édit., Paris, 1957, 165.
-

POUVOIR PATHOGÈNE PARTICULIER DE STREPTOCOQUES, A COLONIES RUGUEUSES, DU TYPE 39 DU GROUPE A.

ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE DE LEURS EXTRAITS DE LANCEFIELD

par R. WAHL, P. CAYEUX et E. DERLOT (*).

(Institut Pasteur, Service des Streptocoques, Paris)

L'examen de 1 800 souches de streptocoques du groupe A isolées de la gorge de 160 enfants sains nous a permis d'identifier 103 souches provenant de 23 sujets différents et possédant des caractères très particuliers.

Ces souches nous avaient été envoyées pour typage par le Centre International de l'Enfance où le P^r Debré et ses collaborateurs effectuent actuellement une enquête épidémiologique portant sur des enfants d'âge scolaire.

MILIEUX DE CULTURE ET MÉTHODES UTILISÉES. — Les prélèvements ont été effectués par le Centre International de l'Enfance selon une méthode permettant de recueillir de nombreuses souches de streptocoques A. Elle consiste à recueillir les prélèvements dans un milieu sélectif [1].

Les souches nous parviennent lyophilisées ou non ; elles sont alors passées une fois sur milieu enrichi à l'ascite sérum, puis isolées sur gélose au sang et cultivées en bouillon glucosé tamponné dont la formule décrite en 1957 [2] a été légèrement modifiée (peptone de fibrine P. T. F. [Réactif] 10 p. 1 000 et peptone tryptique de levure 10 p. 1 000 au lieu de peptone de fibrine 20 p. 1 000 antérieurement). Elles sont étudiées par précipitation en tubes capillaires en présence de sérums anti M et par agglutination sur lame à l'aide de sérums anti T.

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE. — Les cultures en bouillon glucosé tamponné ont l'aspect classique de celles des streptocoques A.

Les colonies sur gélose au sang (pl. I, fig. a) sont un peu plus grandes que les colonies habituelles des streptocoques A (1/2 à 1 mm), et β -hémolytiques.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 juin 1960.

L'examen à la loupe binoculaire (grossissement 25 fois) met bien en évidence leur caractère particulier. Leur surface est rugueuse, très irrégulière, limitée par un bord découpé. Leur centre est souvent le siège d'une dépression plus ou moins profonde.

Dans l'ensemble, ces colonies sont moins bombées que les colonies mates de streptocoques A.

Il faut noter qu'au cours de repiquages successifs, selon les lots de gélose au sang utilisés et leur degré d'humidité, les colonies d'une même souche peuvent montrer d'assez grandes variations de morphologie et même perdre provisoirement leur caractère rugueux. Mais un seul passage en bouillon leur fait récupérer leur morphologie habituelle.

Au cours des essais de virulence, nous avons également constaté qu'une souche, après des passages successifs sur souris, présentait des colonies d'aspect assez différent bien qu'elle fût toujours sérologiquement identique.

Quatre de ces souches rugueuses ont été isolées simultanément sur des plaques de gélose au sang préparées selon la technique habituelle de notre laboratoire [5] et sur un milieu de la formule suivante : extrait de viande Liebig, 5 g ; ClNa, 2,5 g ; Néopeptone Difco, 10 g ; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,7 g ; PO_4HNa_2 , 8,3 g ; eau de source, 1 l ; gélose (Difco Agar), 12 g ; pH, 7,4 ; sang de cheval, 5 p. 100.

Nous n'avons pas constaté de différence entre la morphologie des colonies sur ce milieu et sur notre milieu habituel.

POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL. — Ces souches ont été injectées à la souris sous un volume de 0,5 ml par voie intrapéritonéale.

1° Essais avec des cultures en bouillon de dix-huit à vingt-quatre heures. — Quatre souches ont été injectées (1150, 1516, 1556, 1718). Trois ont tué inconstamment la souris en vingt-quatre à quarante-huit heures à la dose de 0,5 ml de culture pure en injection intrapéritonéale. Dans tous les cas le streptocoque a été retrouvé dans le sang du cœur, mais il n'a jamais été possible d'obtenir d'effet pathogène avec des cultures diluées même au 1/2.

La quatrième souche (n° 1718) n'a provoqué aucun trouble, même en culture non diluée. Toutes les souris ont été observées pendant un délai maximum de seize jours.

2° Essais avec des cultures de cinq heures. — Trois souches ont été inoculées à des souris blanches en cultures de cinq heures (1516, 1519, 2362).

Injectées à la dose de 0,5 ml d'une dilution variant suivant la souche et le passage du 1/10 au 1/60, par voie intrapéritonéale, elles tuent en un à trois jours par septicémie, alors qu'à dose légèrement plus faible elles provoquent l'apparition en six à vingt jours de lésions jusqu'ici non décrites. Ces lésions sont, par ordre de fréquence, des abcès volumineux de la queue, avec souvent

sphacèle noirâtre (pl. I, fig. c) et amputation spontanée de la partie distale, des abcès intra-abdominaux de la taille d'une noisette, adhérents aux plans musculaire et intestinal, entourés d'une coque très épaisse, des péritonites suppurées, des vaginalites avec ulcération et nécrose du scrotum (pl. I, fig. b), de volumineux œdèmes des pattes avec ulcérations.

Toutes ces lésions contiennent de très nombreux streptocoques ayant les caractères bactériologiques et immunologiques de la souche infectante et capables de reproduire les mêmes lésions chez des animaux neufs.

Ces lésions s'accompagnent en général d'amaigrissement net, elles aboutissent parfois à la guérison, mais le plus souvent la mort survient dans un délai variant entre deux à six semaines.

Le foie et la rate sont souvent très hypertrophiés, on peut trouver des abcès à streptocoques dans différents viscères. Dans un cas, l'examen histologique, dû à J. Levaditi que nous remercions, a montré un foie « infectieux » avec polynucléose périportale, des reins normaux, et un abcès volumineux de la sous-muqueuse intestinale (pl. I, fig. d et pl. II).

En cas d'évolution mortelle nous avons retrouvé les mêmes streptocoques dans le sang du cœur.

Des expériences identiques ont été faites avec des souches de streptocoques de types connus (types 15, 24, 30) à des doses sublétales en culture de cinq heures. Nous n'avons jamais obtenu de telles lésions suppurées, même en observant les animaux pendant six semaines. De même des souches non rugueuses du même type sérologique (que nous verrons être le type 39) n'ont pas produit ces lésions suppurées.

En conclusion, ces souches du groupe A se caractérisent par leur virulence très atténuée et par le fait qu'elles provoquent des lésions suppurées tout à fait inhabituelles pour un streptocoque du groupe A. Insistons toutefois sur leur faible pathogénicité ; il n'a jamais été possible de provoquer des lésions avec une dilution plus forte que le 1/60, même après plusieurs passages successifs sur la souris.

ANTIGÈNE PRÉCIPITANT DE TYPE. — Les extraits de Lancefield (E. L.) de ces différentes souches ont été étudiés en tubes capillaires en présence de différents sérums précipitants existant à l'époque dans notre collection (1, 3, 5, 12, 14, 17, 18, 19, 23, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 36, 37, 39, 43, 46).

Toutes les souches rugueuses provenant du Centre international de l'Enfance (souches Rc) sauf une précipitaient en présence du sérum 39 à l'exclusion de tous les autres sérums des autres types connus.

Nous avons préparé, d'une part des sérums précipitants avec la souche Rc n° 1150, d'autre part avec les souches de type 39 qui portent dans notre collection les n° 278 (1) et 297 (1) (souches non rugueuses).

Ces sérums ont été étudiés en présence des E. L. de 24 sou-

TABLEAU I. — Nombre de souches précipitées pour cent par les trois sérums spécifiques, soit sans nouvelle absorption, soit après absorption par les souches XIV et 1173 possédant respectivement les deux antigènes spécifiques en quantité différente.

Souche absorbante	Nombre de souches précipitées pour 100		
	Sérum 1150	Sérum 278	Sérum 297
0	96	86	93
1173	29	70	0,5
XIV	63	22	44
XIV + 1173 (successivement)	0	0	—

ches Rc et de 21 souches de type 39 de collection obligeamment fournies par R. Lancefield, E. Updyke, R. E. O. Williams, R. Pakula et K. Raska. Plusieurs des souches de collection (provenant de R. Lancefield) formaient comme les souches Rc des colonies rugueuses sur notre milieu.

Après absorption, suivant la technique habituelle, par une souche hétérologue, les sérums précipitaient spécifiquement des extraits de Lancefield de presque toutes les souches Rc et 39 de collection.

En particulier, R. E. O. Williams a constaté que notre sérum 1150 précipitait ses souches 39 de collection et que les souches 1516 et 1150 étaient précipitées par le sérum 39.

Cependant, comme le montre le tableau II, la souche XIV (2) ne

(1) Notre souche 278 nous a été envoyée par Williams en mai 1958 sous le n° C95 12B et provenait antérieurement de la collection R. Lancefield.

La souche 297 nous vient de R. Pakula (décembre 1959), mais elle provient de la même souche C95 12B de Williams.

La souche XIV dont il sera question plus loin nous vient de K. Raska (décembre 1959) et provient également de la souche C95 12B de Williams.

(2) Nous rappelons que la souche XIV nous a été envoyée par R. Raska et provient de la souche C95 12B de Lancefield par l'intermédiaire de Williams.

précipite pas avec le sérum 1150 et la souche 1173 Rc ne précipite pas avec les sérums 278 et 297.

Les sérums ont été absorbés d'une part par chacune de ces souches séparément, d'autre part par les deux successivement et mis en présence des E. L. des 45 souches (24 souches Rc et 21 souches 39 de collection).

Les résultats de ces précipitations sont consignés dans les tableaux I et II.

TABEAU II. — Pouvoir précipitant des trois sérums spécifiques pour les souches XIV et 1173, soit sans nouvelle absorption, soit après absorption par une de ces souches ou par les deux successivement.

N° du sérum	absorption subie	E.L. XIV	E.L. 1173
1150	0	0	+
	1173	0	0
	XIV	0	+
	XIV + 1173 (successivement)	0	0
278	0	+	0
	1173	0	0
	XIV	0	0
	XIV + 1173 (successivement)	0	0
297	0	+	+
	1173	+	0
	XIV	0	+

En examinant ces tableaux on constate que les 3 sérums 1150, 278 et 297 précipitent de 85 à 96 p. 100 des E. L. étudiés, qu'il s'agisse de souches Rc ou des souches 39 de collection.

Chaque souche absorbante supprime le pouvoir précipitant de chaque sérum vis-à-vis d'un nombre de souches différent.

Ces résultats, dont l'interprétation sera discutée plus loin, nous permettent de penser que les souches contiennent, en quantité variable selon la souche, deux antigènes spécifiques de type. En particulier, il semble que l'un des antigènes soit plus abondant dans la souche XIV et l'autre dans la souche 1150 ; les sérums 1150 et 297 ont plus d'anticorps correspondant au premier ; le sérum 278 a plus d'anticorps correspondant au second. L'électrophorèse confirme cette impression.

IMMUNOÉLECTROPHORÈSE.

Les immunoélectrophorèses ont été faites suivant la technique de Grabar et Williams (1955) [3] en gélose véronal à pH 8,6 (force ionique 0,025 M dans la gélose, 0,05 M dans les bacs, 5 V/cm).

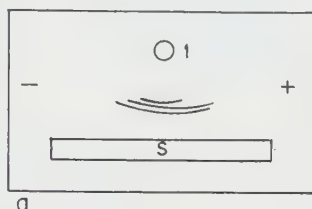


FIG. 1. — 1. E. L. de la souche 297 ; 2. sérum 1150.

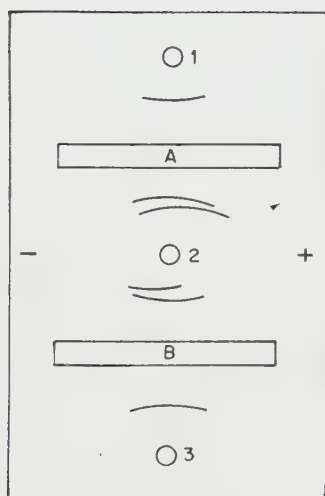


FIG. 2.

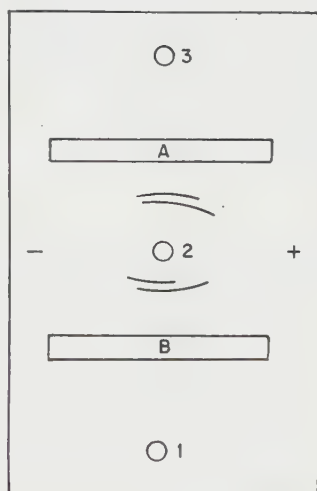


FIG. 3.

FIG. 2 et 3. — 1. E. L. de la souche 1173 ; 2. E. L. de la souche 297 ; 3. E. L. de la souche XIV ; A. sérum 297 absorbé par la souche XIV Raska ; B. sérum 297 absorbé par la souche 1173.

On a utilisé les sérums 1150 et 297 ; les souches XIV et 297. La figure 1 montre qu'en présence du sérum 1150, l'E. L. de la souche 297 donne 3 traits de précipitation.

Sur les figures 2 et 3 on remarque que la souche 297 mise en

présence du sérum 297 absorbé par XIV ou 1173 donne deux traits de précipitation différents pour chacun des sérums. La souche 1173 avec le sérum 297 absorbé par la souche XIV et la souche XIV avec le même sérum absorbé par la souche 1173 donnent un trait unique.

Sur la figure 3, par contre, on note une disparition des traits de précipitation lorsque le sérum 297 est absorbé par la même souche que celle ayant servi à préparer l'extrait de Lancefield.

La présence de 3 traits dans la figure 1 et dans la partie centrale des figures 2 et 3 ne doit pas surprendre, car un travail dont les résultats seront publiés ultérieurement nous a confirmé que la protéine M, telle qu'elle se présente dans les extraits de Lancefield, comporte 2 fractions antigéniques distinctes dont chacune peut donner un trait de précipitation, dans les conditions optima toutefois.

AGGLUTINATION PAR LE SÉRUM ANTI T. — Ces souches semblent dépourvues d'antigène T. En effet, il nous a été impossible de préparer, avec deux de ces souches trypsinées, de sérum anti T.

Néanmoins, la moitié environ de ces souches sont agglutinées par des sérums anti T d'autres types (essentiellement par 1 ou par 8 et 14). Il est fréquent qu'une souche soit agglutinée par 2 ou 3 sérums correspondant à des types qui ne donnent jamais sur les souches jusqu'ici connues d'agglutinations croisées.

DISCUSSION.

1° L'origine de ces souches présente un intérêt particulier. Elles ont été prélevées dans la gorge d'enfants sains. Les prélèvements ont été effectués chez 160 enfants, tous les quinze jours, pendant deux ans, au cours d'une enquête épidémiologique, dont les résultats seront publiés par R. Debré et ses collaborateurs.

Chez la plupart des sujets la souche rugueuse a été retrouvée plusieurs fois (six fois consécutives chez 2 enfants). Ces souches sont donc susceptibles de végéter longtemps dans la gorge à l'état saprophyte.

PLANCHE I

FIG. a. — Aspects divers de colonies rugueuses (toutes au même grossissement).

FIG. b. — Vaginalite suppurée.

FIG. c. — Abscès de la queue, ulcéré.

FIG. d. — Abscès intestinal ($\times 15$, hémateïne, safran, érythrosine) : abscès de la racine du mésentère limité par une membrane fibreuse, sinueuse, et refoulant en doigt de gant la muqueuse intestinale, qui est normale. La lumière intestinale est aplatie.

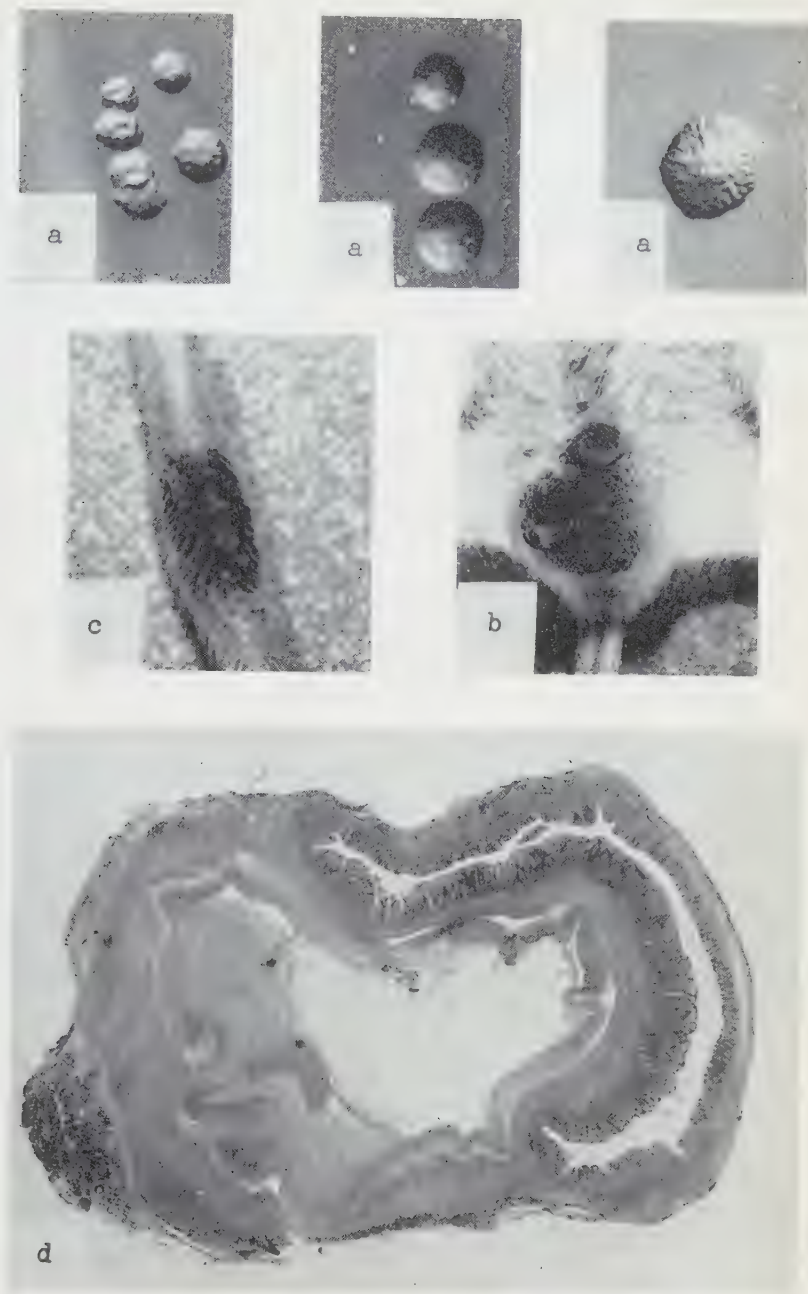


PLANCHE I.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

PLANCHE II

FIG. *a*. — Paroi fibrino-leucocytaire de l'abcès de la planche I fig. *d*. Muqueuse normale ($\times 35$, hématéine, safran, érythrosine).

FIG. *b*. — Contenu de l'abcès : polynucléaires nécrosés et nombreux streptocoques ($\times 610$, Gram brésilienne).



PLANCHE II.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS



Elles sont fréquentes, puisqu'on les a trouvées chez 25 sujets sur 160.

2° La morphologie des colonies ressemble à celle des streptocoques rugueux obtenus par Eagles (1928) [4] par des passages successifs en bouillon sérum d'une souche mate. Comme ces dernières, elles ont des bords irréguliers, donnent en bouillon des cultures granuleuses avec dépôt important. Mais l'aspect de leur surface est assez différent. Eagles, en effet, dit des colonies R qu'elles sont recouvertes de granulations qui ne diffèrent de celles des colonies mates que par leur plus grande taille. Les colonies que nous avons isolées au cours de ce travail sont plus vallonnées que granuleuses.

3° Les cultures de 18 à 24 heures sont très faiblement pathogènes puisqu'elles ne tuent la souris qu'à la dose de 0,5 ml d'une culture pure. Les cultures de 5 heures de la souche 1516 provoquent au contraire des lésions très particulières (lésions suppurées du péritoine, de la vaginale, du tissu cellulaire sous-cutané, d'évolution trainante, accompagnée de cachexie). Ces lésions, inconstamment létales, s'accompagnent en cas de mort de septicémie terminale.

4° L'étude, par la méthode des tubes capillaires et par l'immuno-électrophorèse, de la précipitation des E. L. de ces souches en présence des sérums 1150 Rc, 278 et 297 ainsi que l'absorption de ces sérums par les souches XIV Raska ou 1173 Rc ou par les deux souches successivement, nous permet de penser que la plupart des souches Rc et des souches 39 de collection possèdent deux antigènes M distincts, chacun d'eux pouvant se traduire par deux traits en immuno-électrophorèse.

La richesse plus ou moins grande d'une souche en l'un et l'autre de ces deux antigènes explique qu'elles précipitent différemment en présence de nos divers sérums. Notons d'ailleurs que des subcultures faites dans diverses conditions peuvent donner des modifications dans les proportions respectives des deux antigènes et même la disparition presque totale de l'un des deux comme le montrent les changements subis par la souche C95 12B au cours de ses passages dans divers laboratoires.

Ces sérums contiennent également deux anticorps précipitants de type, différents, mais en proportion variable. C'est pourquoi ils réagissent différemment à une absorption par les souches XIV et 1173 dont la première semble très pauvre en un des deux antigènes alors que l'autre paraît ne posséder que très peu du deuxième.

Ni la souche XIV, ni la souche 1173 Rc ne sont capables d'absorber les anticorps précipitant les E. L. de toutes les souches étudiées, alors que tous nos sérums absorbés successivement par ces deux souches ne précipitent plus aucune des souches étudiées.

5° On peut se demander s'il existe une relation entre l'aspect rugueux des colonies, le pouvoir pathogène spécial chez la souris, le pouvoir pathogène éventuel chez l'homme et la structure antigénique.

a) L'aspect des colonies et le type antigénique, ou l'un des deux, sont-ils en relation plus ou moins étroite avec le pouvoir pathogène spécial chez la souris ? Tout ce qu'on peut dire c'est que, chez la souris, on n'a pas jusqu'ici produit de lésions analogues avec des souches non rugueuses de différents types et même avec deux souches du type 39 non rugueuses.

b) Par ailleurs, chez l'homme, le pouvoir pathogène de ces souches paraît faible ou nul. Mais ceci pourrait être en rapport plus avec le type antigénique qu'avec l'aspect rugueux. En effet, dans les séries de souches provenant de sujets sains que nous avons examinées et qui par conséquent n'avaient pas de rôle pathogène connu, ces souches rugueuses du type 39 étaient fréquentes, alors que parmi les souches non rugueuses de même provenance, nous n'en avons pas trouvé qui appartenaient au type 39. Par ailleurs, le type 39 paraît très rare dans les affections à streptocoques, car E. Updyke n'en a pas trouvé depuis onze ans, sur un nombre considérable de souches typées (communication personnelle).

c) Enfin, le lien entre l'aspect rugueux des colonies et la structure antigénique n'est pas certain. En effet, presque toutes les souches rugueuses que nous avons examinées sont du type 39, mais il y avait une ou deux exceptions ; et beaucoup de souches du type 39 de collection ne sont pas rugueuses.

RÉSUMÉ.

Parmi 1 800 souches de streptocoques du groupe A isolées par le Centre International de l'Enfance, dans la gorge d'enfants en bonne santé, nous avons trouvé 103 souches très particulières provenant de 23 sujets.

Elles donnent des colonies rugueuses d'aspect non encore décrit à notre connaissance, très irrégulières, d'assez grande taille.

Le pouvoir pathogène de trois de ces souches a été étudié chez la souris en culture de 5 heures. Elles ont provoqué, en injections intrapéritonéales, des péritonites, des vaginites, des abcès évoluant très lentement, accompagnés de cachexie. L'évolution peut se faire vers la guérison ou vers une septicémie mortelle.

Elles appartiennent au type sérologique 39.

Elles possèdent deux antigènes précipitants, sérologiquement spécifiques du type, et nous avons pu constater qu'il en était de même pour les souches 39 de collection.

SUMMARY

PECULIAR PATHOGENICITY OF GROUP A,
TYPE 39 STREPTOCOCCI WITH ROUGH COLONIES.
IMMUNOLOGICAL STUDIES ON THEIR LANCEFIELD EXTRACTS.

Eighteen hundred strains of group A streptococci were isolated by the « Centre International de l'Enfance » from the throat of healthy children.

One hundred and three of these strains found in twenty three children were peculiar in many characters.

They produced rough colonies, a fact that, we think, was not reported till now.

The pathogenicity of three of these strains was tested in mice intraperitoneally. Injection of a 5 hours culture induced peritonitis, vaginalitis, abscesses progressing slowly, and cachexia of the animals.

The evolution tended either to recovery or to lethal septicemia.

They belong to serological type 39.

They seem to have two serologically type specific antigens.

We observed that the type 39 strains from various collections possessed the same antigenic characters.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HOLMES (M. C.) et LERMIT (A.). *Monthly Bull. Minist. Hlth*, Londres, 1955, **14**, 97.
 - [2] WAHL (R.) et MEYER (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 43-55.
 - [3] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1955, **17**, 67-74.
 - [4] EAGLES (G. H.). *Brit. J. exp. Pathol.*, 1928, **9**, 330-336.
-

ÉTUDE LYSOGÉNIQUE, LYSOTYPIQUE, SÉROLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE (CHOLERA-ROTH ET RECHERCHE DE LA LYSINE DÉCARBOXYLASE) D'UNE COLLECTION DE VIBRIONS CHOLÉRIQUES ET DE VIBRIONS EL-TOR

par P. NICOLLE, J. GALLUT et L. LE MINOR (*)
(avec la collaboration technique de P. DUCREST, G. BRAULT
et J. QUINIOU).

(Institut Pasteur)

Cent trois souches comprenant 89 vibrions cholériques, 11 vibrions El-Tor et 3 vibrions banaux, isolées en Indochine (40 souches), en Inde (33 souches), en Egypte (14 souches), en Chine (1 souche), en Irak (1 souche), au Hedjaz (3 souches), aux Célèbes (6 souches), ou de provenance inconnue (5 souches), ont été étudiées sous le rapport de leurs caractères sérologiques (types Hikojima, Ogawa, Inaba), biochimiques (recherche de la lysine-décarboxylase = LDC et de la réaction du cholera-roth = C. R.), lysogéniques [souches lysogènes et souches provisoirement considérées comme non lysogènes (1)] et lysotypiques (2).

La méthode de Carlquist [4] permet, par une technique simple et rapide, de mettre en évidence la transformation de la lysine en cadavérine. Elle peut être utilisée soit en partant de cultures sur le milieu liquide peptoné glucosé de Carlquist, soit sur milieu gélosé dit « lactose-glucose-SH₂ » couramment utilisé dans le diagnostic biochimique rapide des Entérobactéries, à condition que celui-ci contienne une peptone tryptique de fibrine ou de caséine [2]. Dans la famille des Entérobactéries, cette recherche présente un intérêt non seulement pour le diagnostic différentiel entre les groupes (certains comme les *Citrobacter* donnant toujours une réaction négative, d'autres comme les *Salmonella* donnant une réaction positive dans la très grande majorité des

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 juin 1960.

(1) On ne peut jamais affirmer qu'une souche n'est pas lysogène. Nous considérons provisoirement comme non lysogènes les souches dont les filtrats de culture de 5 h n'ont exercé aucune action lytique apparente sur les plaques de gélose ensemencées avec la souche sensible Makassar 757 (Vibron El-Tor).

(2) La lysotypie des vibrions cholériques par notre méthode fera l'objet d'une publication ultérieure.

cas) mais encore à l'intérieur de certains groupes, comme celui des *E. coli*. Nous avons en particulier montré l'intérêt épidémiologique de la recherche de la lysine décarboxylase chez les *E. coli* de gastro-entérite du nourrisson [3].

TABLEAU I. — Vibrions cholériques d'Indochine.

Année de l'isolement	Type	Nombre de souches		Lysotype	Réaction LDC	Choléra roth
		lysogènes	non lysogènes			
1931	Hikojima	1		II (?)	+	+
"	"	1		III	-	-
"	"	1		VI	+	-
"	"	1		VI	+	+
"	"	6		VI	-	+
"	"	2		VI	-	-
		12/12			3/12 +	8/12 +
1937	Hikojima	2		IV	+	+
"	"	3		V	+	+
"	"	1		V	+	-
"	"	2		VI	+	+
		8/8			8/8 +	7/8 +
1937	Ogawa	2		III	+	+
"	"	1		V	+	+
1947	"	1		V	+	+
		4/4			4/4 +	4/4 +
1937	Inaba	1		III	-	+
"	"	3		V	+	+
"	"	1		V	+	+
"	"	7		VI	+	+
"	"	4		VI	-	+
		16/16			11/16 +	16/16 +

Les résultats obtenus ont été les suivants :

1° VIBRIONS CHOLÉRIQUES D'INDOCHINE (tableau I). — a) 12 souches Hikojima, isolées en 1931, étaient toutes lysogènes. Elles appartenaient aux lysotypes II (?), III ou VI ; 3 sur 12 étaient LDC positives ; 8 sur 12 étaient C. R. positives.

b) 8 souches Hikojima, isolées en 1937, étaient toutes lysogènes. Elles appartenaient aux lysotypes IV, V et VI ; 8 sur 8 étaient LDC positives ; 7 sur 8 étaient C. R. positives.

c) 4 souches Ogawa, isolées en 1937 et 1947, étaient toutes lyso-

gènes. Elles appartenait aux lysotypes III ou V ; 4 sur 4 étaient LDC positives ; 4 sur 4 étaient C. R. positives.

d) 16 souches Inaba, isolées en 1937, étaient toutes lysogènes. Elles appartenait aux lysotypes III, V ou VI ; 11 sur 16 étaient LDC positives ; 16 sur 16 étaient C. R. positives.

Donc, les 40 souches d'Indochine, quel que soit leur type, étaient lysogènes. On a trouvé parmi elles, une fois le lysotype II (?), quatre fois le lysotype III, deux fois le lysotype IV, dix fois le lysotype V et vingt-trois fois le lysotype VI. Ce dernier lysotype est donc prédominant parmi les souches indochinoises.

Il convient, en outre, de souligner la proportion assez considérable de souches qui n'ont pas donné la réaction de Carlquist (14 souches sur 40). C'est surtout dans le premier groupe (Hikojima, 1931) qu'on a rencontré le plus grand nombre de réactions LDC négatives (9 souches sur 12). Le C. R. a manqué aussi pour 4 souches sur 12.

Trois souches étaient à la fois LDC et C. R. négatives. Une autre était LDC positive et C. R. négative et 6 LDC négatives et C. R. positives.

Il n'y a donc pas de parallélisme complet entre les deux réactions. Notons seulement que les souches de ce groupe sont les plus anciennes des souches indochinoises étudiées.

TABLEAU II. — Vibrions cholériques de l'Inde.

Année de l'isolement	Type	Nombre de souches		Lysotype	Réaction LDC	Choléra roth
		lysogènes	non lysogènes			
1945	Ogawa	1	2	VI	+	+
1953	"		22	III	+	+
"	"		1	V	+	+
"	"		1	V	+	-
"	"		1	V	-	+
"	"		1	VI	+	+
1954	"		1	VI	+	+
		1/29	28/29		28/29 +	28/29+
1954	Inaba		1	III	+	+
"	"		2	VI	+	+
			3/3		3/3 +	3/3 +
1929	Hikojima	1		VI	+	-
		1/1			1/1 +	0/1 +

2° VIBRIONS CHOLÉRIQUES DE L'INDE (tableau II). — a) Sur 29 souches Ogawa isolées en 1945, 1953 et 1954 à Calcutta, on n'a trouvé qu'une seule souche lysogène. Ces souches appartenaient aux lysotypes III, V ou VI; 28 souches sur 29 étaient LDC positives; 28 souches sur 29 étaient C. R. positives (une souche était LDC négative et une autre souche C. R. négative).

b) Aucune des 3 souches Inaba isolées à Calcutta en 1954 n'était lysogène. Toutes les 3 étaient LDC et C. R. positives.

c) Une souche Hikojima isolée en 1929 en Inde était lysogène, LDC positive et C. R. négative.

A l'inverse de ce qu'on a observé pour l'Indochine, les souches indiennes ne sont donc presque jamais lysogènes (31 souches non lysogènes sur 33).

On a identifié parmi les souches indiennes, trois fois le lysotype III, vingt-quatre fois le lysotype V, six fois le lysotype VI. Le lysotype V est donc le lysotype prédominant parmi les souches de l'Inde. La réaction LDC n'a été négative qu'une seule fois sur les 33 souches, le C. R. deux fois également négatif, pour des souches différentes.

Les faits à souligner sont donc la rareté de la lysogénéité parmi les souches indiennes, la fréquence importante du lysotype V (vingt-quatre fois sur 33 souches) et la fréquence des réactions LDC et C. R. qui n'ont été négatives chacune qu'une seule fois.

TABLEAU III. — Vibrions cholériques d'Egypte, de Chine et d'Irak.

Année de l'isolement	Type	Nombre de souches		Lysotype	Réaction LDC	Choléra roth
		lysogènes	non lysogènes			
1947	Inaba		1	IV	+	+
"	"		8	V	+	+
"	"		1	V	+	+
"	"	1		VI	+	-
"	"		3	VI	+	+
		1/14	13/14		14/14 +	13/14 +
Vibron cholérique de Chine						
1932	Hikojima	1		V	+	+
Vibron d'Irak						
1931	Ogawa	1		VI	-	+

3° VIBRIONS CHOLÉRIQUES D'EGYPTE (tableau III). — Sur les 14 souches du type Inaba isolées en 1947, une seule souche était lysogène. Toutes ont donné la réaction LDC et 13 sur 14 le C. R. On a identifié une fois le lysotype IV, neuf fois le lysotype V et quatre fois le lysotype VI. Ici encore, le lysotype V est prédominant parmi les souches égyptiennes.

4° VIBRION CHOLÉRIQUE DE CHINE. — La seule souche du type Hikojima provenant de Shanghai était lysogène, LDC et C. R. positive ; elle était du lysotype V.

5° VIBRION CHOLÉRIQUE D'IRAK. — La seule souche irakienne du type Ogawa isolée en 1931 était lysogène, LDC négative et C. R. positive ; elle était du lysotype VI.

6° VIBRIONS EL-TOR (3) [tableau IV]. — Sur 11 souches au total, 3, très anciennes, provenaient du Hedjaz. Elles étaient du type Hikojima. Parmi celles-ci, une était lysogène, lysotype VI, LDC et C. R. positive et 2 non lysogènes, lysotype I, LDC et C. R. positives.

Sur 6 souches provenant des Célèbes (Makassar), isolées en 1937/1938, 4 étaient du type Hikojima, non lysogènes, lysotype I, LDC et C. R. positives et 2 lysogènes, lysotype II, LDC et C. R. positives.

Enfin 2 souches anciennes de provenance inconnue étaient du

TABLEAU IV. — Vibrions El-Tor de provenances diverses.

Année de l'isolement	Type	Nombre de souches lysogènes non lysogènes		Lysotype	Réaction LDC	Choléra roth
<u>Vibrions El-Tor du Hedjaz</u>						
ancienne	Hikojima	1	2	VI	+	+
anciennes	"			I	+	+
<u>Vibrions El-Tor des Célèbes</u>						
1937/8	Hikojima	2	4	I	+	+
1937/8	"			II	+	+
<u>Vibrions El-Tor de provenance inconnue</u>						
ancienne	Inaba	1	1	VI	+	+
"	"			VI	-	-

(3) La dénomination de vibron El-Tor correspond à la définition classique : vibron agglutinable par le sérum anticholérique 0 et hémolytique pour les globules rouges du mouton. Les vibrions El-Tor des Célèbes provenaient de l'épidémie de Makassar de 1937/1938. Les vibrions El-Tor du Hedjaz ne sont pas pathogènes.

type Inaba, du lysotype VI. L'une était lysogène, LDC et C. R. positive, et l'autre non lysogène et LDC et C. R. négative.

7° VIBRIONS DIVERS. — Trois souches de provenance inconnue dont une du type Inaba, étaient lysogènes, LDC et C. R. positives, lysotypes V et VI.

DISCUSSION.

Dans la mesure où nous sommes autorisés de conclure malgré le nombre restreint de souches que nous avons eues à notre disposition, nous remarquerons que :

1° Huit sur 11 des souches El-Tor étudiées ont pu être groupées dans le lysotype I pour les souches non lysogènes et dans le lysotype II pour les souches lysogènes. Ces deux lysotypes, à une seule exception près (un vibron cholérique Hikojima d'Indochine, qui seul donne des réactions douteuses du lysotype II) ne contiennent pas de vibrions cholériques vrais.

Le lysotype VI a été prédominant dans les vibrions cholériques indochinois, tandis que pour les vibrions cholériques indiens et égyptiens, c'est le lysotype V qui a présenté la plus grande fréquence.

2° Tous les vibrions cholériques provenant d'Indochine (40 souches), quels que soient leur type sérologique, leur lysotype, leurs réactions LDC et C. R., sont lysogènes, tandis que la presque totalité des vibrions cholériques de l'Inde (2 souches lysogènes sur 33) et d'Égypte (1 souche lysogène sur 14) ne le sont pas.

3° La réaction LDC est le plus souvent positive (86 souches positives sur 103, soit 16,50 p. 100 de souches LDC négatives). Mais le pourcentage des souches LDC négatives est plus élevé pour l'ensemble des souches d'Indochine (35 p. 100) et surtout, parmi celles-ci, pour celles qui appartiennent au sérotype Hikojima de 1931 (75 p. 100).

Notons que la réaction LDC a été antérieurement étudiée sur 7 souches de *V. cholerae* par Ogasawara et Karya [4] et qu'elle a été trouvée positive dans tous les cas.

4° C'est également parmi ces souches Hikojima de 1931, que nous avons trouvé la plus forte proportion de souches ne donnant pas la réaction du C. R. (33,33 p. 100 contre 8,73 p. 100 pour l'ensemble des souches étudiées).

5° En dehors de ces cas particuliers, il n'a pu être établi aucune relation entre l'origine géographique des souches, leur type sérologique, leurs propriétés biochimiques (LDC et C. R.) en général. Ces divers caractères paraissent indépendants les uns des autres. On est en droit de penser qu'ils sont tous nécessaires pour définir

avec précision les vibrions cholériques et les vibrions El-Tor et pour les comparer entre eux principalement à des fins épidémiologiques.

Restriction faite de l'éventualité d'une expression plus manifeste de la lysogénéité et d'une perte des caractères LDC positifs et C. R. positifs par le vieillissement des cultures, nous pensons que les faits observés doivent inciter à rechercher systématiquement les caractères mentionnés ci-dessus sur des souches récemment isolées afin de confirmer leur valeur épidémiologique.

RÉSUMÉ.

Les 40 vibrions cholériques (Hikojima, Ogawa et Inaba) isolés en Indochine en 1931, 1937 et 1947, sont tous lysogènes. La plupart donnent les réactions du lysotype VI, quelques-uns (nombreux surtout dans le groupe de souches Hikojima isolées en 1931) ne donnent pas la réaction de Carlquist (recherche de la lysine décarboxylase : LDC), ni celle du cholera-roth (C. R.).

Les vibrions (Ogawa, Inaba, Hikojima) isolés en Inde, principalement à Calcutta (33 souches) et en Egypte (14 souches), en 1929, 1945, 1953 et 1954 ne sont généralement pas lysogènes. Le lysotype V prédomine parmi eux. Ils donnent le plus souvent les réactions LDC et C. R.

Les 11 vibrions El-Tor (Hikojima) provenant du Hedjaz et des Célèbes (1937/1938) donnent généralement des réactions LDC et C. R. Leurs souches non lysogènes appartiennent généralement au lysotype I et leurs souches lysogènes au lysotype II.

Ces constatations doivent inciter à effectuer toutes ces réactions pour parvenir à une définition plus précise des vibrions à étudier.

SUMMARY

LYSOGENIC, PHAGE-TYPING, SEROLOGIC AND BIOCHEMICAL STUDIES (CHOLERA-RED AND DEMONSTRATION OF LYSINE-DECARBOXYLASE) ON VARIOUS CHOLERA AND EL-TOR VIBRIOS.

The 40 cholera vibrios (Hikojima, Ogawa, Inaba) isolated in Indochina in 1931, 1937 and 1947, are all lysogenic. Most of them belong to the VI phage-type; some of them (particularly in the group of Hikojima strains isolated in 1931) yield negative results with the Carlquist's (demonstration of lysine-decarboxylase : LDC) or with the cholera-red (C. R.) reactions.

The vibrios (Ogawa, Inaba, Hikojima) isolated in India (chiefly in Calcutta : 33 strains) and in Egypt in 1929, 1945, 1953, 1954, are generally not lysogenic. They belong for the most part to the V phage-type. They most often yield LDC and C. R. positive reactions.

The 11 El-Tor vibrios (Hikojima) isolated in the Hedjaz and in the Celebes Islands (1937/1938) generally yield positive LDC and C. R. reactions. Their non lysogenic strains belong to the I phage-type, their lysogenic strains to the II phage-type.

These findings show that all these reactions must be carried out to achieve a more accurate determination of the vibrios studied.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CARLQUIST (P. R.). *J. Bact.*, 1956, **71**, 339.
 - [2] THIBAUT (P.) et LE MINOR (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 551.
 - [3] LE MINOR (L.), LE MINOR (S.) et NICOLLE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 786.
 - [4] OGASAWARA (K.) et KARYA (Y.) *Nagoya J. Med. Sci.*, 1954, **17**, 91-92.
-

STRUCTURE DE LA PAROI ECTOPLASMIQUE D'*EBERTHELLA TYPHI*

NATURE ET LOCALISATION DU SUBSTRAT DU LYSOZYME

par L. COLOBERT et O. CREACH (*).

(Laboratoire de Bactériologie
de la Section Technique de Recherches et d'Etudes
des Services de Santé des Armées, Lyon)

Des travaux préliminaires [8, 10, 11, 12, 14] ayant prouvé que la paroi des salmonelles contenait un substrat du lysozyme d'œuf de poule (1), on a entrepris d'isoler et de purifier celui-ci. On a préparé des parois bactériennes isolées, par digestion trypsique du protoplasme coagulé par la chaleur. Les parois obtenues ont alors été dissociées et solubilisées par l'usage d'un corps tensio-actif. Les éléments constitutifs ont été fractionnés sous forme de complexes barytiques et on a identifié et isolé parmi eux le substrat du lysozyme. Les résultats de cette étude permettent de mieux comprendre l'organisation structurale de la paroi ectoplasmique d'*Eberthella typhi*.

TECHNIQUES ANALYTIQUES.

1° LES MÉTHODES DE DOSAGE. — Les glucides totaux ont été évalués par deux méthodes, d'une part le dosage du pouvoir réducteur après hydrolyse, d'autre part le dosage colorimétrique à l'orcinol ou à l'anthrone. On sait en effet que les résultats de la première méthode sont toujours entachés d'une certaine erreur par défaut même quand on s'entoure de précautions particulières [54] ; mais d'autre part, il semble nécessaire de se méfier *a priori* des résultats obtenus par la seconde méthode sur des substances complexes contenant à la fois des glucides, des lipides et des protéines.

Une étude systématique des conditions d'hydrolyse a montré que dans le cas des parois isolées, le taux maximum des substances réductrices était obtenu après huit heures à 100° dans l'acide chlorhydrique 0,5 N, conditions qui ont déjà été adoptées par Davies et coll. [20]

(*) Manuscrit reçu le 20 juin 1960.

(1) Lysozyme cristallisé, commercialisé par la firme Armour, Union Stock Yards, Chicago 9, Illinois.

pour l'étude du polyoside spécifique de *Shigella dysenteriae*. Pour l'hydrolyse de l'antigène somatique et du substrat purifié du lysozyme, nous avons obtenu des résultats sensiblement identiques en opérant dans les mêmes conditions ou en utilisant l'acide chlorhydrique 2 N à 100° pendant quatre heures.

Nous avons vérifié que ce mode opératoire libérait peu d'hexosamines. D'après Montreuil et Scheppeler [44], il ne détruit pas les oses à l'exception du fructose qu'on n'a d'ailleurs jamais identifié dans la paroi ectoplasmique des bactéries.

Les oses libérés par l'hydrolyse ont été habituellement dosés par la méthode de Somogyi [52] suivant le mode opératoire de M^{lle} Staub [54]. Des tubes témoins contenant les mêmes quantités de la substance à étudier, d'acide chlorhydrique et de soude ont été titrés parallèlement. Les résultats sont finalement exprimés en glucose.

Le dosage des glucides sans hydrolyse préalable a été réalisé par la méthode à l'orcinol de Tillmans et Philippi [58] en suivant le mode opératoire décrit par Montreuil et Scheppeler [44], et également par la méthode à l'anthrone suivant la technique de Scott et Melvin [51].

Nous avons constaté que les hexosamines ne sont pas dosées par ces méthodes, mais on manque de renseignements sur l'interférence éventuelle des acides aminés sur le dosage à l'anthrone [21].

Les hexosamines qui résistent bien aux acides forts [44] sauf peut-être l'acide muramique [29], nécessitent pour être libérées une hydrolyse préalable plus intense que celle nécessaire pour libérer les oses non aminés. Nous avons vérifié que, comme le préconise Gardell [27], l'hydrolyse chlorhydrique 6 N à 100° pendant huit heures libère un taux maximum d'hexosamines. Celles-ci ont été dosées par la méthode d'Elson et Morgan [22] dans les conditions préconisées par Montreuil [44] qui permettent de doser correctement les hexosamines en présence de quantités importantes d'oses et d'acides aminés. La principale source d'erreur est due à la présence d'acide muramique dont le comportement dans la réaction d'Elson et Morgan diffère légèrement de celui de la glucosamine [56, 57].

Après une recherche systématique des meilleures conditions d'hydrolyse pour la caractérisation et le dosage des acides aminés, on a opéré en acide chlorhydrique 6 N pendant vingt heures à 100° en ampoules scellées sous vide, en utilisant une suspension à 0,05 p. 100 de produit à analyser. Après élimination de l'acide chlorhydrique, le dosage des acides aminés est pratiqué par la méthode colorimétrique de Moore et Stein, à la ninhydrine [45] suivant le mode opératoire de Spies [53], et également par la méthode de Kemble et Mac Pherson, à la chloramine T [34] suivant le mode opératoire décrit par Colobert [7].

Dans les parois ectoplasmiques, le dosage des lipides totaux a été réalisé suivant la méthode de référence décrite par M^{lle} Faure [23]. Dans le cas de l'antigène somatique et du substrat du lysozyme, on a dosé tout d'abord les lipides non liés par extraction dans un appareil de Kumagawa par l'éther en milieu anhydre. Les lipides liés ont été évalués en appliquant scrupuleusement la technique utilisée par Westphal et coll. pour la préparation du lipide A [26, 66, 69].

Le dosage de l'azote total a été réalisé suivant les cas par la micro-méthode de Lubochinski et Zalta [40] ou par la méthode de Kjeldahl

dans l'appareil de Markham [43] avec les modalités opératoires de Ma et Zuazaga [41].

Le phosphore total a été dosé par la microméthode colorimétrique de Fiske et Subbarow [25] décrite par M^{lle} Faure [23].

2° IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS. — Les oses ont été identifiés par chromatographie sur papier après élimination des ions minéraux et des produits de dégradation des protéines par la technique de Montreuil [44]. Les systèmes solvants utilisés ont été les suivants : *n*-butanol-pyridine-acide chlorhydrique 0,5 N-5/3/2 (descendante) [6] ; *n*-butanol-pyridine-eau-45, 25/40 (ascendante multiple trois fois) [28] ; *n*-butanol-acide acétique-eau-4/1/5 (ascendante) [46].

Les taches ont été révélées au phtalate d'aniline [2].

Pour identifier les hexosamines, on est parti de l'hydrolysât chlorhydrique 6 N dont on a éliminé l'eau et l'acide. Le résidu sec repris dans de l'eau a été soumis à des chromatographies descendantes dans les systèmes solvants suivants : *n*-butanol-acide acétique-eau-4/1/5 [46] ; *n*-butanol-pyridine-eau-6/4/3 [47] ; phénol-eau-100/10 en atmosphère saturée d'ammoniac.

La révélation fut pratiquée au phtalate d'aniline [2], au nitrate d'argent ammoniacal [46] et au réactif d'Elson Morgan [46]. Les déplacements ont été déterminés par rapport à celui du glucose.

Les acides aminés ont été identifiés par chromatographie sur papier après séparation suivant la méthode de Boulanger [5]. Pour les chromatographies unidimensionnelles on a utilisé les systèmes suivants : phénol-eau 100/10 en atmosphère saturée d'ammoniac ; butanol tertiaire-méthyléthylcétone-eau-diéthylamine-40/40/20/4 [47].

La révélation a été obtenue par la ninhydrine acétique.

L'acide diaminopimélique a été séparé par chromatographie ascendante dans le système solvant de Hoare et Work [30] : méthanol-eau-acide chlorhydrique 10 N-pyridine-80/17,5/2,5/10, puis révélé spécifiquement par la méthode de Blass [4].

RÉSULTATS.

1° PRÉPARATION DES BACTÉRIES. — La bactérie étudiée est la souche O-901 d'*Eberthella typhi*, que l'on sait exempte d'antigène Vi, peu riche en antigène H et dont la composition antigénique O est IX, XII₁, XII₂, XII₃.

La culture a été pratiquée en milieu liquide glucosé, oxygéné et agité, préparé de la manière suivante.

Dans une marmite en aluminium, on introduit 300 g d'hydrolysât de caséine (2) et 14,7 l d'eau du robinet. On dissout en chauffant légèrement et en agitant. On ajuste le pH à 7,4 par la soude à 50 p. 100 (environ 10 cm³). On ajoute une petite quantité d'antimousse (3).

(2) Industrie Biologique Française, 35, 49, quai du Moulin-de-Cage, Gennevilliers (Seine).

(3) S. I. Antimousse A. F. en émulsion. Société Industrielle des Siliques et des Produits Chimiques, 1 bis, place des Saussaies, Paris-8°.

Dans un flacon conique, on prélève un échantillon de 500 cm³ qui servira à la préculture. Le reste est versé dans un flacon en Pyrex de 20 l à col large. On monte sur ce flacon la turbine en forme de bicône (4) qui servira à l'agitation et à l'aération et on stérilise à l'autoclave à 120°, l'appareil monté. L'appareil encore chaud est installé dans une chambre dont la température est réglée à 37° et on attend que l'équilibre des températures soit réalisé. On introduit alors par une tubulure spéciale 300 cm³ d'une solution de glucose à 50 p. 100, stérilisée par filtration.

En vue de la préculture, on inocule avec les bactéries développées en vingt-quatre heures à 37° sur la surface d'un tube de gélose inclinée, le flacon de préculture qui a été stérilisé en même temps que l'appareil complet. Après un développement de vingt heures à 37° le contenu du flacon de préculture est introduit dans l'appareil contenant les 17 l de milieu nutritif. L'oxygénation du milieu est assurée par l'arrivée, sous la turbine, d'oxygène provenant d'une bouteille de gaz comprimé, oxygène stérilisé par filtration sur une colonne de poudre d'amiante stérile de 30 × 500 mm. L'oxygénation et l'agitation sont poursuivies sans arrêt jusqu'au moment de la récolte à laquelle on procède à la quarante-huitième heure.

A ce moment, le développement maximum étant atteint, les bactéries sont recueillies par centrifugation dans une centrifugeuse Sharples tournant à 50 000 t/mn. L'opération dure deux heures trente environ. Le culot bactérien est aussitôt remis en suspension dans un tampon phosphate 0,066 M de pH 7,17 dont la composition pour 1 l est la suivante : PO₄HNa₂, 12 H₂O : 16,717 g ; PO₄H₂K : 2,723 g.

On ajuste la densité optique de cette suspension de telle manière qu'à la longueur d'onde de 720 mμ elle soit égale à 0,970 après avoir été diluée vingt-cinq fois. La suspension est alors répartie en ampoules que l'on scelle, à raison de 20 cm³ par ampoule ; le rendement moyen d'une récolte est de 300 cm³ de suspension, ce qui correspond à 7,7 g de bactéries sèches.

2° OBTENTION DES PAROIS ISOLÉES ET SÉPARATION DES CONSTITUANTS DE STRUCTURE. — Les procédés mécaniques qui permettent de préparer des parois isolées, ont l'inconvénient de laisser souvent persister des fragments de cytoplasme et de la membrane cytoplasmique, ainsi que le montrent des coupes minces examinées au microscope électronique [59]. Les procédés enzymatiques y obvient, mais ils modifient chimiquement la paroi en dissolvant des éléments qui lui appartiennent en propre, la perte de poids pouvant atteindre 45 p. 100 [29]. Nous avons néanmoins fait appel

(4) Rouyer, Pillet, Orta et Nicol [48] ont décrit l'emploi d'une turbine commercialisée sous le nom de « Bicône Thiberge » (Etablissements Thiberge, 56, avenue de Chatou, Rueil, Seine-et-Oise), facile à adapter aux flacons Pyrex du commerce et qui permet l'agitation et l'aération profonde.

à un de ces procédés en utilisant la trypsine (5) dans des modalités voisines de celles employées par Salton et Horne [49]. Cette enzyme ne risque pas en effet d'altérer les fractions polysidiques de la paroi parmi lesquelles doit se trouver le substrat du lysozyme ; de plus, du fait de sa spécificité d'action très étroite et de l'existence d'un fort pourcentage des formes dextrogyres des acides aminés dans les fractions polypeptidiques et de l'absence d'acides aminés basiques dans la paroi, on pouvait espérer que le nombre de liaisons rompues — s'il y en avait — serait extrêmement faible. Malheureusement, des essais préliminaires, en accord avec les observations d'autres auteurs, ont montré que la trypsine n'attaquait nullement le protoplasme des bactéries vivantes et qu'il était nécessaire de dénaturer les protéines protoplasmiques pour que celles-ci puissent être hydrolysées. On procède donc à un chauffage ménagé, dans les conditions qui permettent d'obtenir la lyse par le lysozyme [42].

Il est très difficile d'évaluer les altérations éventuellement provoquées dans la paroi, mais une chose est certaine : après la digestion enzymatique, l'addition de Teepol commercial désintègre totalement les parois alors qu'il n'en est rien sur les bactéries entières. Peut-être ce fait est-il la conséquence de l'hydrolyse par la trypsine de quelque élément protéique de la texture pariétale, mais peut-être aussi est-il la conséquence d'un accès direct de la substance tensio-active à la surface interne de la paroi, surface normalement inaccessible dans la bactérie entière.

Les modalités opératoires sont les suivantes. Les ampoules scellées contenant les bactéries en tampon phosphate, sont immergées dix minutes exactement dans un bain-marie bouillant, puis immédiatement refroidies à l'eau courante. On peut les conserver indéfiniment à 4° sans altération.

Lorsqu'on dispose d'un minimum de 6 récoltes (soit environ 40 g de bactéries sèches) les bactéries sont recueillies par centrifugation. Elles sont lavées dans le tampon phosphate, puis finalement remises en suspension dans le tampon. La suspension est ajustée de manière à présenter la densité optique de 0,970 à 720 m μ , pour une dilution au 1/25.

À cette suspension, on ajoute une solution de trypsine préparée extemporanément (5 mg par centimètre cube dans le tampon phosphate) à raison de 3 cm³ pour 27 cm³ de suspension. On ajoute quelques gouttes de toluène pour éviter les fermentations et on incube à 37° pendant douze heures. On centrifuge alors trente minutes à 19 000 t/min pour séparer l'insoluble du surnageant.

Le culot est remis en suspension dans le volume primitif de tampon phosphate et on recommence une trypsination identique à la précédente,

(5) La trypsine purifiée de l'Institut Pasteur de Paris donnant les mêmes résultats que la trypsine trois fois cristallisée, nous avons fait appel à elle exclusivement.

prolongée pendant vingt-quatre heures. Après cela, l'opération est encore répétée trois fois, ce qui fait un total de 5 trypsinations. Finalement, le culot est remis en suspension dans un petit volume d'eau distillée et on dialyse contre de l'eau distillée pendant quarante-huit heures. L'examen au microscope photonique après coloration mais surtout l'examen au microscope électronique, permettent de constater qu'apparemment, toute trace de protoplasme a disparu ; seules persistent les parois vides.

TABLEAU I. — Caractéristiques de la trypsination.

Rendement : 6 récoltes donnent 7,9 g de parois (poids sec), soit 17 p. 100 du poids sec des bactéries.	
Variations de la densité optique à la suite des traitements par la trypsine.	
Au départ	0,970
Après la première trypsination	0,250
Après la deuxième trypsination	0,200
Après la troisième trypsination	0,110
Après la quatrième trypsination	0,100
Après la cinquième trypsination	0,090

On a procédé aux dosages des glucides, des lipides et de l'azote total dans les parois isolées. Ces dosages ont été effectués sur les parois séchées d'abord par lyophilisation puis par extraction sous vide en présence d'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant.

Les glucides réducteurs ont été dosés par la méthode de Somogyi [52], après une hydrolyse dans l'acide chlorhydrique 0,5 N à 100° pendant huit heures. Leur taux, exprimé en glucose, est compris entre 15,48 et 17 p. 100 selon les échantillons.

Les lipides totaux ont été évalués par la méthode de référence décrite par M^{lle} Faure [23]. Le taux obtenu est de 30,3 p. 100. Nous n'avons pas dosé séparément les lipides non liés et les lipides liés.

L'azote total a été dosé par la méthode de Lubochinski et Zalta [40]. On a trouvé 5,55 p. 100 d'azote. En supposant que tout cet azote provienne des protides — ce n'est sûrement pas le cas puisque nous avons caractérisé notamment des oses aminés — en admettant qu'en moyenne l'azote représente la 6,25^e partie du poids moléculaire des acides aminés, la fraction protéique des parois représenterait près de 35 p. 100 de leur poids.

En 1957, Colobert [8, 11, 12] a montré que la paroi externe des principales salmonelles pathogènes pour l'homme : *Eberthella typhi*, *Salmonella para A* et *Salmonella para B*, pouvait être

dissoute par le lysozyme à condition que les bactéries aient été au préalable sensibilisées soit par un chauffage ménagé, soit par un traitement par le sel de sodium de l'acide éthylène-diamine-tétracétique [E. D. T. A.] (6) ou par des alcoylsulfates [7]. En suivant la lyse au photomètre et au microscope électronique, les conditions d'expérience suivantes furent reconnues optima. On prépare la suspension bactérienne en tampon tris (8) 0,05 M de pH 8,5, contenant de l'E. D. T. A. à la concentration de 0,027 g pour 100 cm³. On ajoute alors le lysozyme. Dans ces conditions, une concentration de 150 µg/cm³ provoque une lyse rapide. Les parois isolées se lysent dans les mêmes conditions, mais il est avantageux d'utiliser une concentration plus élevée de lysozyme. D'une manière habituelle nous avons effectué tous nos essais sur une suspension de parois contenant 21,5 mg de produit sec par centimètre cube de tampon, correspondant après hydrolyse à 3 320 µg de sucres réducteurs totaux exprimés en glucose. On opère de la manière suivante.

Dans un tube à essais en Pyrex de 20 × 2 cm on introduit successivement : 9,6 cm³ de suspension de parois dans le tampon tris (21,5 mg/cm³) ; 1,2 cm³ de solution d'E. D. T. A. dans le tampon tris (2,66 mg/cm³) ; 1,2 cm³ de lysozyme en tampon tris (10 mg/cm³).

On prépare un tube témoin identique, où le lysozyme est remplacé par 1,2 cm³ de tampon tris, et un blanc ne contenant pas de parois. On porte ces trois tubes dans un bain-marie à 37° pendant une heure. On ajoute alors dans chacun 1 cm³ de solution à 12 p. 100 de chlorure de sodium dans de l'eau distillée ce qui améliore le rendement de la réaction. Après agitation on remet les tubes au bain-marie pendant une heure.

Pour doser les glucides libérés, on centrifuge le contenu de chaque tube à 25 000 t/min pendant trente minutes et on titre par la méthode de Somogyi le pouvoir réducteur dans 5 cm³ de surnageant limpide. Dans ces conditions, le lysozyme libère 194 µg de glucides réducteurs par centimètre cube de surnageant, soit 7,9 p. 100 des glucides réducteurs totaux obtenus par hydrolyse de la suspension de parois. Si on laisse la réaction se poursuivre pendant vingt-quatre heures, ce taux atteint 263 µg/cm³, soit 10,7 p. 100 des glucides totaux. Les glucides libérés ne sont

(6) Commercialisé sous le nom de *Versene* ou de *Complexon III*.

(7) Il s'agit du « Teepol » commercial qui est une solution à 21 p. 100 d'alcoylsulfates secondaires. Shell-Saint-Gobain, 29, rue de Berri, Paris.

(8) Tri-hydroxy-amino-méthane. Serlabo, 26, rue Saint-Gilles, Paris. Pour obtenir un tampon 0,2 M, on prépare une solution contenant 24,2 g de tris pour 1 000 cm³, puis une solution d'acide chlorhydrique 0,2 N. Le pH de 8,5 est obtenu en mélangeant 25 cm³ de la solution de tris, 8,25 cm³ de solution acide et en complétant à 100 cm³.

d'ailleurs pas des monoses, car si on hydrolyse ces surnageants huit heures à 100° dans l'acide chlorhydrique 0,5 N, le taux des glucides réducteurs a passé par exemple dans une expérience, de 185 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ à 449 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, soit 2,42 fois plus.

Une part importante des glucides qui passent en solution sous l'action du lysozyme sont des glucides aminés. On l'a mis en évidence de la manière suivante. Dans trois ampoules de 5 cm^3 on introduit 2 cm^3 de surnageant de chacun des tubes et 1 cm^3 d'acide chlorhydrique 12 N (ce qui fait une concentration finale de 4 N). On hydrolyse douze heures à 100°. L'hydrolysate est ensuite évaporé à sec et repris par 2 cm^3 d'eau. Alors que le témoin ne contient pas d'hexosamines, on trouve que le lysozyme en a libéré 153 μg exprimés en glucosamine, pour 1 cm^3 de surnageant. Les glucides réducteurs libérés au cours de la même expérience étant de 185 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, le pourcentage des hexosamines libérées par rapport aux glucides libérés, est de 82,7 p. 100, soit 6,25 p. 100 des glucides réducteurs totaux.

3° SÉPARATION DES CONSTITUANTS DE STRUCTURE A PARTIR DES PAROIS ISOLÉES. — Dans un travail antérieur, l'un de nous avait montré que les parois de salmonelles ayant subi une trypsination consécutive à un chauffage ménagé, acquièrent la propriété de se dissoudre complètement dans une solution diluée de Teepol commercial alors qu'il n'en est rien pour des bactéries vivantes ou des bactéries trypsinées [8]. Nous avons utilisé cette propriété pour séparer les éléments des parois. Par ce procédé peu traumatisant, on peut en effet espérer obtenir les éléments de structure, ce que ne permettent pas les hydrolyses acides ou alcalines auxquelles beaucoup d'auteurs ont fait appel jusqu'à présent pour obtenir la dissolution totale des parois. On opère de la façon suivante.

La suspension de parois est dialysée contre de l'eau distillée de façon à se trouver débarrassée des sels et des substances de faible poids moléculaire éventuellement libérés par la trypsine, puis ajustée de telle manière qu'une dilution au demi présente une densité optique de 0,970 à 720 $\text{m}\mu$. On ajoute alors la solution commerciale de Teepol à raison de 0,3 cm^3 pour 2,7 cm^3 de suspension. On agite le mélange pendant deux heures au minimum, à la température du laboratoire. La densité optique mesurée dans les mêmes conditions tombe alors entre 0,500 et 0,600. On centrifuge cette suspension à 6 000 t/min pendant trente minutes. On obtient ainsi un surnageant limpide. Les culots se montrent constitués de produits amorphes, non organisés. On hydrolyse alors par l'acide chlorhydrique 0,5 N pendant huit heures à 100°.

L'analyse donne les résultats suivants : 1,2 p. 100 de substances réductrices exprimées en glucose, 40 à 50 p. 100 de lipides suivant les échantillons, 20 p. 100 de cendres et 0,85 p. 100 d'azote.

La présence de Teepol même à l'état de trace, inhibe l'activité du lysozyme et il est nécessaire, à ce stade, d'éliminer totalement du surnageant cette substance tensio-active. Cette élimination s'est avérée extrêmement difficile. Elle a été réalisée finalement en s'appuyant sur la propriété suivante que nous avons pu mettre en évidence : les alcoyl-sulfates contenus dans le Teepol précipitent en présence d'un sel de baryum soluble, mais le précipité contient aussi les sulfates existant dans le produit commercial.

Après cette addition de baryum, il est possible d'éliminer les cations et de transformer en acides correspondants les alcoyl-sulfates, constituants principaux du Teepol, par traitement par une résine échangeuse de cations ; les acides alcoylsulfuriques obtenus sont solubles dans l'éthanol même anhydre, ce qui permet leur extraction. Le substrat du lysozyme forme lui-même une combinaison insoluble avec le baryum.

Les opérations sont menées de la façon suivante : on mesure le volume V du surnageant obtenu après l'addition de Teepol. On ajoute, sous agitation magnétique constante, une solution aqueuse à 25 p. 100 de chlorure de baryum (Cl_2Ba , $2\text{H}_2\text{O}$), à raison de 2 cm³ pour 30 cm³. Il se forme un abondant précipité. Après une agitation supplémentaire de trente minutes, on sépare le précipité qui contient le substrat, par centrifugation à 6 000 t/min pendant trente minutes. On le remet en suspension dans de l'eau distillée en ramenant le volume à V.

Toujours sous agitation, on ajoute une suspension dans l'eau de résine XE-66 B (9) sous forme acide, à raison de 10 cm³ de suspension de résine pour 100 cm³ de suspension de culots. La suspension se sépare aussitôt en deux phases, d'une part un précipité constitué par la résine qui a fixé les cations, et d'autre part un surnageant opalescent qui contient les constituants des parois bactériennes sous forme colloïdale, et notamment le substrat du lysozyme, mais aussi les acides alcoylsulfuriques du Teepol. On écarte la résine par centrifugation à 6 000 t/min pendant trente minutes.

Dans des ampoules de décantation de 1 l, on introduit 685 cm³ d'éthanol à 95 p. 100 et 100 cm³ de surnageant. Après mélange, on laisse reposer une nuit à + 4°. L'insoluble se décante. On le retire et le concentre par centrifugation à 6 000 t/min pendant vingt minutes. Il est alors lavé trois fois dans l'éthanol anhydre. Toutes ces opérations depuis l'addition de baryum, sont poursuivies à la température de $4^\circ \pm 2^\circ$. Dans ces conditions, les acides alcoylsulfuriques sont entraînés par l'éthanol, et le précipité contient les constituants des parois débarrassés du Teepol. Ceux-ci représentent 1,547 g pour 7 récoltes de bactéries, soit 2,9 p. 100 du poids sec des bactéries ou 16,8 p. 100 du poids des parois sèches.

(9) Variété pharmaceutique de l'amberlite IR 120, résine anionique puissante capable de fixer les ions sodium d'une solution de sulfate de sodium. Rohn et Haas Company, Philadelphie 5, Pennsylvania.

On entreprend alors l'extraction du précipité par le tampon trihydroxyméthylaminométhane-acide chlorhydrique 0,2 M de pH 8,5. Pour ce faire, on agite le précipité avec 250 cm³ de tampon pendant six heures à la température du laboratoire et le liquide d'extraction est recueilli par centrifugation à 25 000 t/min. Le culot est repris une fois dans les mêmes conditions, puis deux nouvelles fois dans le même tampon contenant en plus, cette fois, 1,5 mg de sel de sodium de l'acide éthylène diaminetétracétique par centimètre cube, afin d'extraire tout le baryum possible. On sépare ainsi une fraction soluble. Celle-ci et la fraction insoluble, sont dialysées séparément contre de l'eau distillée, puis on lyophilise le contenu des sacs de dialyse.

Le constituant insoluble représente environ 22 p. 100 de l'insoluble précipité par le baryum, soit 3,7 p. 100 du poids des parois ou 0,64 p. 100 du poids sec des bactéries. Le constituant soluble représente environ 78 p. 100 de l'insoluble précipité par le baryum, soit 13,1 p. 100 du poids des parois ou 2,27 p. 100 du poids sec des bactéries.

4° PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES DEUX CONSTITUANTS ISOLÉS. -- Les deux constituants ainsi isolés se montrent très différents l'un de l'autre dans leurs propriétés biologiques. Tout d'abord le lysozyme est absolument sans action sur la fraction soluble, alors qu'au contraire, il libère des substances réductrices de nature glucidique lorsqu'on le fait agir sur le constituant insoluble. Les essais ont été conduits de la façon suivante.

Dans un tube à essais en Pyrex de 20 × 2 cm, on introduit successivement : 4 cm³ de suspension de substrat à 1,6 mg/cm³ dans le tampon tris, puis 0,25 cm³ d'une solution d'E. D. T. A. à 2,66 mg/cm³ dans le tampon tris, puis 0,25 cm³ de solution de chlorure de sodium à 12 p. 100, enfin 0,50 cm³ de solution de lysozyme à 10 mg/cm³ dans le tampon tris. On maintient le tube deux heures au bain-marie à 37°. On prépare un témoin identique mais dans lequel le lysozyme n'est ajouté qu'après la solution cuivrique servant au dosage des glucides. Ceux-ci sont dosés dans chaque tube par la méthode de Somogyi [52]. On constate que dans le tube où le lysozyme a agi il y a 140 µg de glucides réducteurs de plus que dans le tube témoin. La prise d'essai correspond à $4 \times 1,6 = 6,4$ mg de produit titrant 0,13 p. 100 de glucides réducteurs soit 584 µg pour la prise d'essai. Le lysozyme a donc libéré 24 p. 100 des glucides réducteurs.

La fraction soluble est très pyrogène ; l'injection au lapin de 1 µg par voie intraveineuse provoque en moyenne une augmentation de température de 1°3. Au contraire, il faut injecter dans les veines 1 mg de la fraction insoluble constituant le substrat du lysozyme pour provoquer une augmentation de température de

l'ordre de 1°. De même la fraction soluble est très toxique. Une seule injection intraveineuse de 1 mg suffit à tuer les lapins en quelques jours. Une seconde injection identique quatre jours après la première, les tue en quelques heures. En revanche, la fraction insoluble ne paraît nullement toxique ; des injections répétées par voie intraveineuse de 1 mg tous les quatre jours sont parfaitement bien tolérées.

Les deux fractions diffèrent également dans leur capacité antigénique. L'injection intraveineuse de 1 µg de la fraction soluble deux fois par semaine pendant cinq semaines provoque chez le lapin l'apparition d'anticorps agglutinant *Eberthella typhi* (agglutination O) au titre de 1/256. Au contraire, il faut le même nombre d'injections d'une dose mille fois plus élevée de produit insoluble pour provoquer l'apparition d'un taux identique d'anticorps de ce type.

5° COMPOSITION CHIMIQUE DES DEUX CONSTITUANTS ISOLÉS. — La composition de la fraction hydrolysable par le lysozyme a déjà fait

TABLEAU II. — Données analytiques pour la fraction soluble et pour la fraction insoluble.

Nature des dosages pratiqués (g. p. 100)	Nature des constituants analysés	
	Fraction soluble (antigène somatique)	Fraction insoluble (substrat du lysozyme)
Baryum	0	11,3
Azote total	5,94	6,1
Phosphore total	2,11	0,49
Lipides totaux	22,33	15,4
Lipides liés	10,61	10,7
Lipides non liés	11,72	4,7
Acides aminés :		
- dosés par la chloramine T	30,86	36,3
- dosés par la ninhydrine	42,6	54,0
Glucides réducteurs (après hydrolyse)	23,3	9,13
Glucides totaux :		
- dosés par l'orcinol	23,13	13,9
- dosés par l'anthrone	17,6	7,9
Hexosamines	5,73	10

l'objet d'une note [15]. Les tableaux II et III permettent de la comparer à celle de la fraction soluble non hydrolysable par le lysozyme. On remarquera que, dans les deux cas, il s'agit de complexes

glucidolipidoprotéiques. Le constituant soluble contient des oses non aminés alors que le substrat du lysozyme ne semble contenir

TABLEAU III. — Nature des constituants glucidiques et des constituants protéiques, identifiés dans la fraction soluble et dans la fraction insoluble.

Composition comparative des deux fractions isolées	
Nature des constituants identifiés par chromatographie sur papier	
dans la fraction soluble (antigène somatique)	dans la fraction insoluble (substrat du lysozyme)
glucose	absence de glucose (ou traces)
mannose	absence de mannose
galactose	absence de galactose
rhamnose	absence de rhamnose
glucosamine	glucosamine
absence d'acide muramique	acide muramique
acide aspartique	acide aspartique
acide glutamique	acide glutamique
alanine	alanine
glycocolle	glycocolle
thréonine	absence de thréonine
valine	absence de valine
leucine	absence de leucine (ou traces)
sérine	absence de sérine (ou traces)
absence de lysine	lysine
absence d'acide diaminopimélique	acide diaminopimélique

que des glucides aminés dont notamment de l'acide muramique. De même il contient exclusivement de l'acide diaminopimélique et une variété moins grande d'acides aminés.

DISCUSSION.

Il est parfaitement établi, aujourd'hui, que l'antigène somatique complet extractible des bactéries à Gram négatif par des procédés très divers, est un complexe glucidolipidoprotéique. Dans le cas d'*Eberthella typhi* on identifie dans la fraction glucidique après hydrolyse le D-glucose, le D-mannose, le D-galactose, le L-rhamnose

et pour les bactéries qui sont en phase S un didésoxyaldohexose, le tyvélose [49]. On a également caractérisé la glucosamine [67].

Les constituants protéiques de l'antigène somatique dépendent beaucoup du procédé utilisé pour préparer celui-ci et ne contiennent qu'un nombre limité d'acides aminés. Les plus souvent rencontrés sont l'acide glutamique, l'alanine, l'acide aspartique, le glyco-colle et la sérine ; on peut rencontrer plus rarement les autres acides aminés entrant dans la composition des protéines communes.

La fraction lipidique de l'antigène somatique complet n'en représente pas moins de 25 à 40 p. 100. Elle est constituée de deux lipides différents, l'un est fortement lié à la fraction glucidique et à la fraction protéique, Westphal le désigne sous le nom de *lipide A* ; l'autre, dont la liaison est moins solide, est désigné par cet auteur sous le nom de *lipide B* [67, 68]. Cette substance serait un phospholipide ; elle est facile à extraire par l'action de la formamide additionnée de traces d'acide formique ou sous l'action du phénol dilué. Au contraire, l'extraction du lipide A nécessite une hydrolyse acide prolongée, par exemple par l'acide chlorhydrique normal pendant trente minutes à chaud. Le lipide A insoluble dans l'eau précipite alors. Difficile à dissoudre dans l'éther et le benzène, il est facilement soluble dans le chloroforme et la pyridine [67].

Pour diverses raisons, Westphal pense que le lipide A est lié d'une part au polyoside par l'intermédiaire de la glucosamine, et d'autre part à la protéine par l'intermédiaire d'un acide aminé dicarboxylique (aspartique ou glutamique) [67, 68].

L'antigène somatique complet représente environ 80 p. 100 de la paroi, mais non la totalité de celle-ci. Quand on prépare des parois isolées, par exemple par broyage mécanique [31] ou par dislocation par les ultrasons [4], et que l'on extrait l'antigène somatique contenu dans ces parois, par exemple par le phénol aqueux suivant la technique de Westphal et coll. [66], il persiste toujours une enveloppe insoluble qui conserve la forme de la bactérie et qui paraît rigide. Cette fraction se montre également constituée de glucides, de lipides et de protéines. Les glucides sont caractérisés par leur teneur élevée en hexosamines et par la présence de l'acide muramique (3-O- α -carboxyéthylhexosamine) qui n'existe pas dans l'antigène somatique. De même, les protéines sont caractérisées par la présence des acides diaminopimé-liqués ou de la lysine, qu'on ne rencontre pas dans l'antigène somatique. Miss Work a attiré l'attention sur un point très important : on peut caractériser dans les parois des bactéries à Gram positif, mais aussi dans celles des bactéries à Gram négatif, un constituant glycopeptidique de composition presque invariable et

qu'elle appelle pour cette raison « basal wall unit », c'est-à-dire le *constituant fondamental de la structure pariétale*. Chez les bactéries à Gram négatif, il libère après hydrolyse d'une part de l'alanine, de l'acide glutamique, des acides diaminopiméliques ou de la lysine, et parfois du glycolle, de l'acide aspartique ou de la sérine, et d'autre part, de la glucosamine et de l'acide muramique [70].

D'après ces données, l'identification des deux fractions que nous avons isolées est facile. La fraction soluble, non hydrolysable par le lysozyme, toxique et antigénique, est manifestement l'antigène somatique complet dont elle possède la composition chimique. On notera en particulier que l'on a identifié après hydrolyse, le glucose, le mannose, le galactose et le rhamnose, connus pour être responsables de l'antigénicité IX et XII [55] (10). Le substrat du lysozyme non toxique et peu antigénique possède la composition caractéristique du « constituant fondamental de la structure pariétale », mais ses éléments glucidiques et protéiques paraissent solidement liés à un lipide, ce qui constitue une notion nouvelle.

En dehors de l'analyse chimique, d'autres moyens d'investigation ont apporté des renseignements précieux sur l'organisation structurale de la paroi ectoplasmique des bactéries à Gram négatif. Ainsi, l'étude de l'effet des détergents sur les parois isolées apporte également la preuve de l'existence dans celles-ci de deux types de constituants. Bolle et Kellenberger, ayant étudié l'effet d'une solution de laurylsulfate de sodium à 0,2 p. 100 sur une suspension de parois isolées d'*Escherichia coli*, ont observé que la turbidité baisse rapidement en quelques minutes pour atteindre un palier dû à l'insolubilité d'un élément des parois. L'analyse de celui-ci leur a montré qu'il était constitué d'acide diaminopimélique, d'acide glutamique, d'acide muramique, de glycolle, d'alanine, de glucosamine et de lysine, c'est-à-dire très précisément des éléments du « constituant fondamental de la paroi » commun aux espèces à Gram positif et à Gram négatif [3].

L'étude de l'action de la pénicilline et d'autres antibiotiques a permis de recouper ces données. On sait qu'à doses toxiques la pénicilline provoque chez les bactéries à Gram négatif des troubles de la formation de la paroi ectoplasmique [38, 39]. Dans le cas de *Salmonella gallinarum*, étudié par Salton et Shafa [50], de l'antigène somatique persiste encore dans les sphéropastes obtenus par l'action de la pénicilline, l'altération semblant localisée au niveau du constituant responsable de la rigidité de la paroi [50]. Dans le cas de *Vibrio metchnikowi* et de *Salmonella gallinarum*,

(10) On n'a pas caractérisé le tyvélose qui aurait nécessité une recherche particulière.

la pénicilline provoquerait une réduction du taux des glucides aminés et également de l'acide diaminopimélique, la perte se situant entre 30 et 50 p. 100 [50]. En revanche, on n'a pas observé de différences qualitatives dans les principaux glucides non aminés présents et dans les acides aminés N terminaux.

C'est par un mécanisme analogue que l'on a pu interpréter l'apparition des formations L à partir des bactéries normales. Ainsi Kandler [32, 33] a montré que si des quantités appréciables d'acide diaminopimélique peuvent être caractérisées dans la forme bactérienne normale de *Proteus vulgaris* et chez les formations L stabilisées. Mac Quillen [42] a montré qu'un mutant d'*Escherichia coli* incapable de synthétiser l'acide diaminopimélique et pour lequel celui-ci constitue un facteur de croissance indispensable, peut cependant se développer dans un milieu de tonicité convenable si l'acide diaminopimélique est remplacé par la lysine ; mais les bactéries prennent alors la même forme sphérique qu'après un traitement par la pénicilline, forme qui rappelle celle des protoplastes obtenus par dissolution spécifique par le lysozyme des parois des bactéries sensibles. Ainsi se trouve établie la notion que les acides diaminopiméliques ainsi que la lysine et partant le « constituant pariétal fondamental » dont ils font partie, sont les éléments responsables de la rigidité de la paroi, notion qui se trouve corroborée par l'étude du mécanisme de la lyse bactériophagique.

Des travaux de Weidel et coll (11) [35, 60, 61, 62, 63, 64, 65] résulte la notion importante qu'alors que les récepteurs des phages de la série T sur *Escherichia coli* sont étroitement spécifiques, l'enzyme bactériolytique provenant des différents phages possède un substrat identique dans les différentes souches de la bactérie. L'action de cette enzyme sur des parois isolées fait notamment passer en solution un peptide contenant de l'alanine, de l'acide glutamique et presque tout l'acide diaminopimélique [64], qui sont précisément les acides aminés du « constituant fondamental »

(11) Weidel et coll. [61, 64] ont appelé « couche lipopolyosidique » la couche insoluble dans le phénol, et « couche lipoprotéique » la couche soluble dans le phénol. Ces dénominations nous paraissent impropres [46] ; en effet, d'une part, la couche insoluble dans le phénol contient un constituant peptidique et, de plus, le terme « lipopolyoside » sert souvent à désigner le complexe glucido-lipidique obtenu à partir de l'antigène O complet. D'autre part, les travaux de Westphal et coll. [66, 67] sur l'antigène somatique et ceux de Weidel et coll. [62] sur le récepteur du phage T5 permettent de penser que la couche dite « lipoprotéique » n'est pas autre chose que l'antigène somatique qui aurait peut-être été modifié par perte de la fraction glucidique au cours de l'autolyse utilisée par Weidel [59] pour la préparation des parois.

responsable des propriétés mécaniques de la paroi. Weidel et Primosigh [63] ont d'ailleurs montré qu'il existe un parallélisme entre l'action de la pénicilline et celle de l'enzyme des phages. On a montré, d'autre part, que cette dernière a une spécificité d'action identique à celle du lysozyme d'œuf de poule, qu'elle constitue en somme un lysozyme [37].

En traitant les parois d'*Escherichia coli* à l'état sec, par une solution aqueuse de phénol à 90 p. 100, on en dissout 80 p. 100. Le résidu insoluble, représentant les 20 p. 100 restant, contient des glucides et des lipides à côté des acides aminés caractéristiques du « constituant fondamental de la paroi » et paraît donc constituer la charpente de cette dernière [64, 65]. Cette fraction insoluble est justement hydrolysable par l'enzyme des phages [64, 65]. L'utilisation de ces derniers comme indicateurs, a permis de préciser les positions relatives des deux fractions : la partie soluble dans le phénol se trouverait à la surface de la paroi et recouvrirait la partie insoluble plus interne [63].

Nos résultats analytiques obtenus chez *E. typhi*, se situent donc sans difficulté dans le cadre de ces données. Le substrat du lysozyme d'œuf n'est autre que le « constituant fondamental de la structure pariétale », décrit par Miss Work, qui paraît être responsable de la rigidité et des propriétés mécaniques de la paroi ectoplasmique et est déjà connu dans le cas d'*E. coli* comme le substrat du lysozyme des phages de la série T. Solidement lié à une fraction lipidique, il constitue la *couche interne* de la paroi, recouverte à l'extérieur par l'antigène somatique. Celui-ci n'est nullement hydrolysable par le lysozyme, contrairement à ce que les résultats d'une étude immunologique préliminaire — d'interprétation évidemment complexe — nous avait incité à penser [10, 14]. On comprend que la position superficielle de cet antigène somatique complet interdise normalement au lysozyme d'atteindre le substrat profond, et qu'il soit nécessaire de procéder à un conditionnement préliminaire pour provoquer par cette enzyme la lyse des bactéries [8, 11]. Cette conception paraît voisine de celle à laquelle Weidel vient de se ranger, compte tenu de la terminologie spéciale à cet auteur [65].

Bien qu'il ne soit pas certain que la paroi ectoplasmique ne contienne pas d'autres éléments que ceux identifiés jusqu'ici, il paraît utile de tenter de résumer les connaissances acquises dans un schéma de la structure de la paroi des bactéries Gram-négatif.

La membrane cytoplasmique n'est pas autre chose que la limite de séparation entre la phase protoplasmique et le milieu extérieur. Il est vraisemblable que celle-ci est constituée de molécules orientées de telle manière que la tension superficielle soit minimum ; les lipides s'y accumulent donc et les groupements

hydrophobes tendent à s'orienter vers la surface (12). Dans ces conditions, pour des raisons analogues, il est logique de penser que les lipides de la couche interne de la paroi ectoplasmique (substrat du lysozyme) doivent se trouver en contact avec ceux de la membrane cytoplasmique. Pour les mêmes raisons encore, on peut s'attendre à ce que les lipides de la couche externe de la paroi (antigène somatique) se trouvent en contact avec les lipides de la couche interne.

Mais la rigidité de la paroi et la cohésion mécanique de celle-ci sont liées au « constituant fondamental », c'est-à-dire au glycopeptide de la couche interne. Nous avons trouvé d'autre part que ce dernier est solidement fixé au lipide ; on peut ainsi admettre, comme l'a fait Weidel, que le constituant glycopeptidique forme un réseau de mailles isolant les îlots de nature lipidique. Cet auteur vient en effet de montrer que l'attaque de la couche profonde d'*Escherichia coli* (couche R dans la terminologie de l'auteur) libère des particules sphériques insolubles ; la nature lipidique de celles-ci nous paraît très probable. Les observations de Weidel objectivent l'hypothèse que le glycopeptide fondamental constitue une trame, un réseau, enchâssant les granules sphériques [65].

S'il en est ainsi, il est naturel de penser que la fraction polypeptidique du constituant externe entre en contact, sinon en combinaison, avec la fraction de même nature du constituant interne. Il paraît, d'autre part, démontré que ce polypeptide de la couche externe occupe une position tout à fait superficielle. En effet, d'après Weidel et coll. [61, 64], les récepteurs des phages T2 et T6 qui se situent dans ce polypeptide sont directement accessibles aux phages dans la bactérie intacte. Kröger [37] a montré enfin que ce polypeptide injecté au lapin provoque la formation d'anticorps qui peuvent se fixer en totalité sur les bactéries intactes homologues ; ce qui ne paraît possible que si le polypeptide se trouve à la surface des bactéries.

Quant aux polyosides antigéniques spécifiques fortement hydrophiles, il convient de leur assurer une situation superficielle en accord avec la plupart des auteurs. M^{lle} Staub [55] a établi que le chaînon glucidique terminal de l'antigène IX est : tyvélose-mannose-mannose ; alors que l'antigène XII, branché, compor-

(12) Des tentatives récentes d'identification des constituants de la membrane cytoplasmique des bactéries sont en faveur de l'existence d'une couche protéique tout à fait extérieure [18, 24]. Malheureusement ces analyses ont été réalisées sur des « fantômes » obtenus par l'action du lysozyme sur *Micrococcus lysodeikticus* ; il est très probable que ces fantômes ne représentent pas la membrane cytoplasmique dans son état naturel ; le lysozyme, en particulier, y demeure fixé et il n'est pas possible de le détacher sans détruire les « fantômes » [9, 13].

terait le rhamnose et le glucose comme oses terminaux. On sait d'autre part que la fraction polyosidique est liée au lipide par l'intermédiaire de la glucosamine, alors que ce dernier est lié au peptide par l'intermédiaire d'un acide aminé dicarboxylique [67,

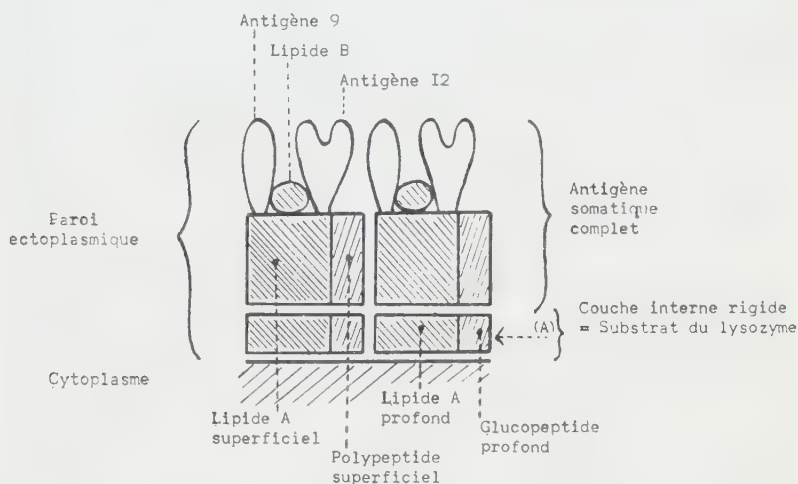


FIG. 1. — Schéma de la structure de la paroi avec ses deux couches superficielle et profonde, en coupe transversale.

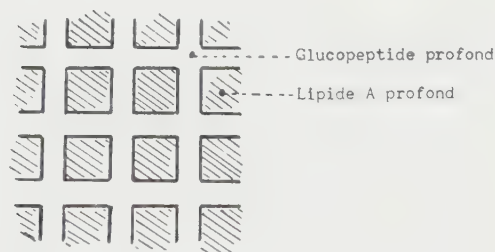


FIG. 2. — Coupe longitudinale de la couche interne suivant (A).

68]. Les figures 1, 2 et 3 illustrent ces données, le lipide B non lié y est représenté en position externe.

On est encore réduit aux hypothèses sur la nature des liens existant entre les constituants de la couche externe et ceux de la couche interne de la paroi. Peut-être s'agit-il simplement de solvation réciproque, d'affinité de surface entre éléments homologues,

ce qui permettrait de comprendre l'extrême facilité avec laquelle se libère partiellement ou totalement l'endotoxine superficielle. Peut-être s'agit-il de liaisons hydrogènes, facilement dissociables par les solvants très polaires ou par l'urée ; la possibilité, comme l'a montré Repaske, d'obtenir la lyse par le lysozyme de bactéries à Gram négatif en les traitant préalablement par une résine échangeuse de cations, permet d'imaginer une liaison entre les deux couches par l'intermédiaire d'un ion divalent. Mais peut-être aussi se trouvent impliquées, bien que cela paraisse moins probable, de véritables liaisons de covalence établies par exemple entre le

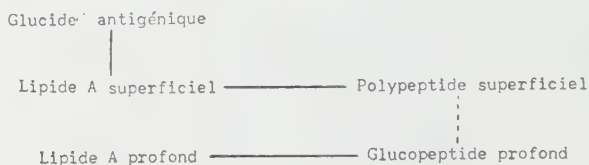


FIG. 3. — Représentation schématique de la structure pariétale.

polypeptide superficiel et le polypeptide profond par le truchement des restes d'acide diaminopimélique qui demeurent aptes à constituer des ponts peptidiques.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Afin d'isoler et de purifier le substrat du lysozyme contenu dans les parois ectoplasmiques d'*Eberthella typhi* (souche 0-901), on a préparé celles-ci par digestion trypsique des bactéries coagulées par la chaleur. L'usage d'alcoylsulfates secondaires (solution commerciale de Teepol) permet de dissocier leur texture et de faire passer en solution leurs constituants. L'addition de chlorure de baryum précipite deux complexes de nature glucido-lipido-protéique. La chélation du baryum par l'acide éthylène-diamine-tétracétique permet de remettre en solution l'un d'entre eux et de le séparer de l'autre qui demeure insoluble.

Les propriétés biologiques et la constitution chimique du complexe soluble, permettent de l'identifier à l'antigène somatique O (endotoxine) et partant à la couche externe de la paroi ectoplasmique. Le complexe insoluble comporte une fraction glucidique et une fraction polypeptidique dont la composition est celle du « constituant fondamental de la structure pariétale », support des propriétés mécaniques de la paroi et notamment de la rigidité. Ces fractions, elles-mêmes solidement liées à un lipide,

forment la couche interne de la paroi et paraissent être le seul constituant hydrolysable par le lysozyme.

Des considérations théoriques permettent de tenter de reconstituer la structure de la paroi à partir de ces éléments. La fraction lipidique du substrat du lysozyme serait en contact avec la membrane cytoplasmique et maintenue en place par un réseau de mailles rigide, constitué de la fraction glycopeptidique de la couche profonde, riche en oses aminés et en acide diamino-pimélique. Le lipide de l'antigène somatique constituant la couche externe de la paroi, viendrait en contact avec le lipide de la couche profonde, sa fraction protéique entrant en liaison avec le glycopeptide profond, les chaînons osidiques hydrophiles constituant les antigènes IX et XII se trouvant tournés vers le milieu extérieur. Le lipide non lié occuperait une position superficielle, sans doute en rapport avec le lipide lié du complexe endotoxique (antigène somatique). Cette structure tient compte de l'ensemble des connaissances acquises sur la paroi, non seulement par l'analyse antigénique et l'analyse chimique mais encore par l'étude de l'action des détergents, de la pénicilline, des bactériophages et du lysozyme.

SUMMARY

STRUCTURE OF THE CELL-WALL OF *Eberthella typhi*.

NATURE AND LOCALISATION OF THE LYSOZYME SUBSTRATE.

With a view to isolating and purifying the lysozyme substrate contained in the cell-walls of *E. typhi* (strain O-901), these cell-walls have been prepared by means of tryptic digestion of heat-coagulated bacteria. It is possible to dissociate them by the use of secondary alcoylsulfates (commercial Teepol); their constituents pass into the solution. By chelating baryum, ethylene-diamine tetracetic acid permits their separation, one of them dissolving, the other remaining insoluble.

The biological properties and the chemical structure of the soluble complex allow to identify it as the somatic O antigen (endotoxin), consequently as the external layer of the cell-wall.

The insoluble complex contains one glucidic and one polypeptidic fraction; the composition of the latter is that of the « basal wall unit » responsible for the mechanical properties of the cell-wall, specially its rigidity. These fractions being firmly bound to a lipid constitute one unic component, which seems to be the only lysozyme substrate and forms the internal layer of the cell-wall.

The authors propose a scheme of the cell-wall structure based on these data. The lysozyme substrate lipidic fraction is supposed to be in contact with the cytoplasmic membrane and kept

in position as by a network of rigid meshes, made of the deep layer glycopeptidic fraction, rich in aminosugars and diamino-pimelic acid. The lipid of the somatic antigen, which constitutes the external cell-wall layer might be in contact with the lipid of the deep layer, and be bound itself to the deep glycopeptide ; its hydrophilic osidic links (IX and XII antigens) being turned towards the external medium. The non-bound lipid is supposed to occupy a superficial position, probably in relation with the bound lipid of the endotoxic antigen complex (somatic antigen).

This scheme is in agreement with the present knowledge about the cell-wall, resulting not only of the antigenic or chemical analysis methods, but of the study of the activity of detergents, penicillin, phages and lysozyme.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLASS (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1958, **40**, 1003.
- [2] BLOCK (R. J.), DURRUM (E. L.) et SWEIG (G.). *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*. Academic Press Inc., New-York, 1958, 181.
- [3] BOLLE (A.) et KELLENBERGER (E.). *Pharm. Acta Helv.*, 1958, **33**, 379.
- [4] BOSCO (G.). *J. inf. Dis.*, 1956, **99**, 270-4.
- [5] BOULANGER (P.), BIZERTE (G.) et COURTOT (F.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 366.
- [6] BOURILLON (R.) et MICHON (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1959, **41**, 267.
- [7] COLOBERT (L.). *Thèse Sciences*, Paris, 1955, n° 3728.
- [8] COLOBERT (L.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, sup. 1, 135.
- [9] COLOBERT (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1957, **151**, 114-116.
- [10] COLOBERT (L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 2863-2865.
- [11] COLOBERT (L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 1674-1676.
- [12] COLOBERT (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **85**, 156.
- [13] COLOBERT (L.). *C. R. VII^e Congr. Intern. Microbiol.*, Stockholm, 1958, 419.
- [14] COLOBERT (L.) et SERVANT (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 549.
- [15] COLOBERT (L.) et CREACH (O.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1960.
- [16] CREACH (O.). *Thèse Pharmacie*. Lyon, 1960, n° 631.
- [17] CRUMPTON (M. J.). *Biochem. J.*, 1959, **72**, 479.
- [18] DANIELLI (J. F.). *Cytology and Cell Physiology*. Bourne, édit., O. U. P., Oxford, 1951, 150.
- [19] DAVIES (D. A. L.). *Biochem. J.*, 1955, **59**, 696.
- [20] DAVIES (D. A. L.), MORGAN (M. T. J.) et RECORD (B. R.). *Biochem. J.*, 1955, **60**, 220.
- [21] DISCHE (Z.). In GLICK (D.). *Methods of biochemical analysis*, 1955, **2**, 313.
- [22] ELSON (L. A.) et MORGAN (W. T. I.). *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1820.
- [23] FAURE (M.). In LOISELEUR (J.). *Techniques de Laboratoire*. Masson et C^{ie}, Paris, 1954, **1**, 715.
- [24] FEW (A. V.), GILBY (A. R.) et DEAMAN (G. V. F.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **38**, 130.

- [25] FISKE (C. M.) et SUBBAROW (Y.). *J. biol. Chem.*, 1925, **66**, 375.
- [26] FROMME (I.), LUDERITZ (O.), NOWOTNY (A.) et WESTPHAL (O.). *Pharm. Acta Helv.*, 1958, **33**, 391.
- [27] GARDELL (S.), In GLICK (D.). *Methods of biochemical analysis*, 1958, **6**, 289.
- [28] GLEGG (R. E.) et EIDINGER (D.). *Anal. Chem.*, 1954, **26**, 1365.
- [29] HAYASHI (J. A.) et BARKULIS (S. S.). *J. Bact.*, 1959, **77**, 177-184.
- [30] HOARE (D. S.) et WORK (E.). *Biochem. J.*, 1955, **61**, 562.
- [31] HUGO (W. B.). *Bact. Rev.*, 1954, **18**, 87.
- [32] KANDLER (O.) et ZEHENDER (K.). *Z. Naturforsch.*, 1957, **12 b**, 725-728.
- [33] KANDLER (O.), HUND (A.) et ZEHENDER (C.). *Nature*, 1958, **181**, 572-573.
- [34] KEMBLE (A. R.) et MACPHERSON (H. T.). *Biochem. J.*, 1954, **56**, 548.
- [35] KOCH (G.) et WEIDEL (W.). *Z. Naturforsch.*, 1956, **11 b**, 345.
- [36] KOCH (G.) et DREYER (W. J.). *Virology*, 1958, **6**, 291.
- [37] KROGER (E.). *Z. Naturforsch.*, 1955, **10 b**, 704.
- [38] LEDERBERG (J.). *Proc. nation. Acad. Sci.*, 1956, **42**, 574.
- [39] LEDERBERG (J.). *J. Bact.*, 1957, **73**, 144.
- [40] LUBOCHINSKY (B.) et ZALTA (J. P.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36**, 1363.
- [41] MA (T. S.), ZUZAGA (G.). *Ind. Engng. Chem. (Anal.)*, 1942, **14**, 280.
- [42] MAC QUILLEN (K.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, **27**, 410-411.
- [43] MARKHAM (R.). *Biochem. J.*, 1942, **36**, 790.
- [44] MONTREUIL (J.) et SHEPPLER (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1959, **41**, 13.
- [45] MOORE (S.) et STEIN (W. H.). *J. biol. Chem.*, 1948, **176**, 367.
- [46] PARTRIDGE (S. M.). *Biochem. J.*, 1948, **42**, 238.
- [47] REDFIELD (R. R.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 344.
- [48] ROUYER (M.), PILLET (J.), ORTA (B.) et NICOL (M. J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 276.
- [49] SALTON (M. R. J.) et HORNE (R. W.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 177.
- [50] SALTON (M. R. J.) et SHAFI (F.). *Nature*, 1958, **181**, 1321-1324.
- [51] SCOTT (T. A.) et MELVIN (E. H.). *Anal. Chem.*, 1953, **28**, 1656.
- [52] SOMOGYI (M.). *J. biol. Chem.*, 1952, **195**, 19.
- [53] SPIES (J. R.). In COLOWICK (S. P.) et KAPLAN (N. O.). *Methods in enzymology*, 1957, **3**, 467.
- [54] STAUB (A. M.). In LOISELEUR (J.). *Techniques de laboratoire*. Masson et C^{ie}, Paris, 1954, **1**, 769.
- [55] STAUB (A. M.), TINELLI (R.), WESTPHAL (O.) et LUDERITZ (O.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **96**, 303-332.
- [56] STRANGE (R. E.) et POWELL (J. F.). *Biochem. J.*, 1954, **58**, 80-85.
- [57] STRANGE (R. E.) et DARK (F. A.). *Nature*, 1956, **177**, 185-188.
- [58] TILLMANS (J.) et PHILIPPI (K.). *Biochem. Z.*, 1929, **215**, 36.
- [59] WEIBULL (C.). *Proc. Third. Int. Congr. Biochem.* Bruxelles, 1955, **411**.
- [60] WEIDEL (W.). *Z. Naturforsch.*, 1951, **6 b**, 251.
- [61] WEIDEL (W.), KOCH (G.) et LOMSS (F.). *Z. Naturforsch.*, 1954, **9 b**, 398.
- [62] WEIDEL (W.), KOCH (G.) et BOBOSCH (K.). *Z. Naturforsch.*, 1954, **9 b**, 573.
- [63] WEIDEL (W.) et PRIMOSIGH (J.). *Z. Naturforsch.*, 1957, **12 b**, 421.

- [64] WEIDEL (W.) et PRIMOSIGH (J.). *J. gen. Microbiol.*, 1958, **18**, 513.
- [65] WEIDEL (W.), FRANK (H.) et MARTIN (H. H.). *J. gen. Microbiol.*, 1960, **22**, 158.
- [66] WESTPHAL (O.), LUDERITZ (O.) et BISTER (F.). *Z. Naturforsch.*, 1952, **7 b**, 148.
- [67] WESTPHAL (O.) et LUDERITZ (O.). *Angew. Chem.*, 1954, **66**, 407-417.
- [68] WESTPHAL (O.), LUDERITZ (O.), EICHENBERGER (E.) et NETER (E.). *Ciba Symposium on Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*. J. et A. Churchill, Londres, 1957, 187.
- [69] WESTPHAL (O.), NOWOTNY (A.), LUDERITZ (O.), HURNI (H.), EICHENBERGER (E.) et SCHONHOLZER (G.). *Pharm. Acta, Helv.*, 1958, **33**, 401.
- [70] WORK (E.). *Nature*, 1957, **179**, 841.
-

**RÉACTIONS ENTRE DES ACIDES
DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES DIVERSEMENT DÉNATURÉS
OU DÉGRADÉS ET LES ANTICORPS ANTI-ACIDE
DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE DU SÉRUM DE MALADES
ATTEINTS DE LUPUS ÉRYTHÉMATEUX DISSÉMINÉ**

par E. BARBU, M. SELIGMANN et M. JOLY (*)
[avec la collaboration technique de M^{me} L. ALAIS] (**).

(Institut Pasteur)

L'un de nous a constaté que le sérum de certains malades atteints de lupus érythémateux disséminé (L. E. D.) donne une réaction de précipitation [1] et de fixation du complément [2] avec l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ce fait a également été observé par deux autres groupes de chercheurs travaillant indépendamment [3, 4, 5], puis confirmé par d'autres auteurs [6, 7]. La réaction avec l'ADN a aussi été décelée par d'autres techniques [8, 9, 10, 10 bis].

La substance des sérums de L. E. D. qui réagit avec l'ADN a des propriétés analogues à celles d'un anticorps [11, 11 bis]. Cet anticorps réagit avec l'ADN lui-même ; il réagit indifféremment avec des ADN d'origines très différentes (humaine, animale, bactérienne). Tel est aussi le cas pour les anticorps anti-acide ribonucléique obtenus après l'immunisation du lapin par des ribosomes [12].

Comme il est très difficile de produire des anticorps anti-ADN par l'immunisation d'animaux (la plupart des résultats publiés dans la littérature ne sont pas probants et nos essais dans ce sens ont jusqu'ici été infructueux), le sérum de malades atteints de L. E. D. constitue une source privilégiée pour étudier ces anticorps. C'est pourquoi nous avons voulu tenter d'identifier les groupements spécifiques de la molécule d'ADN avec lesquels réagissent ces anticorps (sites réactifs). Dans ce but, nous avons

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} juillet 1960.

(**) Travail effectué avec l'aide de l'Institut National d'Hygiène (Prof. L. Bugnard).

soumis des solutions d'ADN à divers traitements, puis cherché à apprécier, après chacun de ces traitements, d'une part les modifications de taille, de forme et de composition chimique des produits obtenus, et d'autre part, le comportement de ces produits dans la réaction avec les anticorps du sérum de L. E. D.

MATERIEL ET METHODES

MATÉRIEL.

Nous avons utilisé un ADN de thymus de veau préparé selon la méthode de Schwander et Signer [13], légèrement modifiée [14]. Trente mg de cet ADN ne donnent aucun précipité protéique, après hydrolyse à 95° C en présence d'acide trichloracétique à 5 p. 100.

Divers traitements ont été appliqués à cet ADN (sauf indications contraires, la concentration d'ADN utilisée était de 350 µg/ml dans NaCl 0,14 M) :

1° Irradiation ultraviolette pendant vingt minutes en plaçant la solution à une distance de 30 cm d'une lampe Mazda Germicide de 16 W, émettant dans ces conditions environ 110 µW par centimètre carré à la surface de la solution.

2° Mise au contact d'aldéhyde formique commerciale à 10 p. 100 pendant vingt-quatre heures, puis dialyse. L'un des échantillons a été chauffé à 70° C pendant dix minutes, en présence d'aldéhyde formique à 10 p. 100 puis dialysé.

3° Irradiation par les ultrasons pendant des durées d'une minute à une heure, sous atmosphère d'hydrogène (générateur SCAM à quartz piézo-électrique de fréquence 800 Khz et de puissance acoustique totale d'environ 120 W).

4° Chauffage pendant quinze minutes à 85° C ou pendant vingt minutes à 100° C, à pH neutre, puis refroidissement rapide à la température de l'eau du robinet.

5° Alcalinisation à l'aide de NaOH à divers pH compris entre 12 et 13 ; après quinze minutes de contact à la température du laboratoire, on neutralise à l'aide d'acide chlorhydrique. Certains échantillons ont été chauffés soit à 37° C, soit à 80° C, pendant des temps variables avant d'être neutralisés.

6° Acidification par l'acide chlorhydrique à divers pH compris entre 1,5 et 2,1 ; certains de ces échantillons ont été maintenus à ces pH pendant quinze minutes à la température du laboratoire puis neutralisés par la soude ; d'autres échantillons ont été maintenus à une température de 30° C ou 37° C pendant des durées allant d'une heure à quarante-huit heures, avant d'être neutralisés.

7° Dégradation par la désoxyribonucléase (DNase N. B. Co cristallisée une fois) à 21°5 C et à pH 7,5 ; ces solutions contenaient 320 µg/ml d'ADN, du tampon tris 0,01 M, du sulfate de magnésium 0,01 M et de la DNase à différentes concentrations. L'action de la DNase est arrêtée

après des délais variables, en ajoutant à chaque échantillon un volume égal de versène 0,1 M pH neutre. Les échantillons sont conservés à la température de -20°C .

Pour l'une des expériences, nous avons traité une solution contenant 1 750 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN par de fortes quantités de DNase (50 $\mu\text{g/ml}$). Après un séjour de trois heures à la température de 25°C , l'enzyme a été éliminée par agitation du mélange en présence de chloroforme.

L'acide ribonucléique (ARN) a été isolé à partir de microsomes de foie de lapin ou de ribosomes bactériens selon la méthode de Schramm et coll. [15].

Les sérums utilisés provenaient de malades atteints avec certitude de L. E. D. et contenaient des quantités variables d'anticorps anti-ADN. Chacune des expériences a été effectuée avec trois sérums de malades différents.

MÉTHODES.

1° Les modifications de taille et de forme des particules d'ADN ont été appréciées d'après les résultats des mesures de biréfringence d'écoulement et de viscosité selon les techniques déjà décrites [16]. La dégradation de l'ADN a été appréciée d'une part en mesurant la précipitation en présence d'acide perchlorique 0,5 N et, d'autre part, en mesurant, après une dialyse de quatre jours, le spectre d'absorption des produits ayant et n'ayant pas traversé le sac de dialyse. Le pourcentage de bases puriques détachées a été calculé en faisant, dans chaque cas, le rapport entre la densité optique à 260 $m\mu$ des produits ayant traversé le sac de dialyse et la densité optique obtenue lorsque les bases sont complètement détachées. Afin d'éviter toute erreur pouvant intervenir au cours de la dialyse, on a vérifié que le maximum d'absorption des produits qui ne traversent pas le sac de dialyse se trouve à 270 $m\mu$ tandis que celui des produits qui traversent le sac de dialyse se situe à 258 $m\mu$.

2° La capacité de réaction avec les anticorps du sérum de L. E. D. a été appréciée, pour chacun des ADN modifiés, dénaturés ou dégradés, par les méthodes suivantes :

a) *Épreuve de précipitation inter-faciale* (ring-test) avec des concentrations croissantes de l'ADN modifié, en partant de la concentration la plus faible donnant, pour l'ADN non modifié une réaction positive avec le même sérum de L. E. D. (cette concentration minima est en général de 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Les résultats de cette épreuve, qui est grossière mais qui a l'avantage de la simplicité, ne peuvent pas être interprétés sur le plan quantitatif. Nous les avons indiqués par les signes + + +, + +, +, (+), \pm ou —, en fonction de la concentration minima de l'ADN modifié donnant encore une réaction positive.

b) *Courbes de précipitation*. — Pour certains des échantillons d'ADN dénaturés ou dégradés, nous avons établi des courbes de précipitation spécifique, à pH 8,2 ou 8,6, en dosant les protéines des précipités (soigneusement lavés) par le réactif du biuret [17] ou par le réactif de Folin-Ciocalteu [18]. Les courbes de précipitation obtenues ont été comparées à celles données par l'ADN non modifié. Ces courbes de pré-

cipitation n'ont pu être établies que pour un nombre restreint d'échantillons, faute d'une quantité suffisante de sérum.

c) *Réaction de fixation du complément.* — Pour chacun des échantillons d'ADN modifié, la réaction de fixation du complément a été effectuée dans des conditions déjà décrites [2], en utilisant des solutions de cet ADN à concentrations croissantes (comme pour l'épreuve de précipitation interfaciale).

Pour un certain nombre d'échantillons, nous avons utilisé une technique quantitative (1), les différents éléments de la réaction étant employés dans des conditions analogues à celles décrites par Wadsworth et coll. [49]. On a étudié la fixation de 3 unités (50 p. 100 de complément) par l'ADN, natif ou modifié, à différentes concentrations, mis en présence de différentes dilutions de sérum de L. E. D. De cette façon, on a pu mieux apprécier la capacité d'union de ces ADN avec les anticorps. Mais, comme cette technique n'a été utilisée que pour certains échantillons, les résultats d'ensemble ont été exprimés par des signes analogues à ceux employés pour l'épreuve de précipitation interfaciale.

d) *Epreuves de neutralisation.* — Pour chacun des échantillons réagissant encore avec les sérums de L. E. D., nous avons recherché la quantité minima d'ADN modifié nécessaire pour neutraliser tous les anticorps précipitants contenus dans 1 ml d'un sérum de L. E. D. donné, en contrôlant la neutralisation par l'épreuve de précipitation interfaciale et par la réaction de fixation du complément. Nous avons comparé cette quantité à la quantité minima d'ADN non modifié nécessaire pour obtenir la même neutralisation.

Pour chacun des échantillons ne donnant pas de précipitation avec les anticorps du sérum de L. E. D., nous avons cherché à inhiber ces anticorps, en utilisant, bien entendu, un grand excès d'ADN modifié.

RÉSULTATS

I. — TRAITEMENTS DE L'ADN N'ENTRAINANT PAS DE MODIFICATION DES RÉACTIONS IMMUNOLOGIQUES.

Même après dénaturation ou dégradation importante, l'ADN est encore capable de réagir avec les anticorps présents dans les sérums de L. E. D.

On trouvera sur le tableau I la liste des traitements préalables de l'ADN après lesquels les réactions avec le sérum de L. E. D. (précipitation interfaciale, fixation du complément, épreuve de neutralisation) restent analogues à celles que donne l'ADN non modifié. En outre, les courbes de précipitation données par l'ADN chauffé pendant quinze minutes à 85° C et par l'ADN soumis sous H₂ à l'action des ultrasons pendant une heure, ont

(1) Nous remercions vivement le Dr V. Nussenzweig, qui nous a aidés à réaliser ces expériences.

été étudiées. La courbe donnée par l'ADN chauffé était strictement identique à celle donnée par l'ADN natif. L'une des courbes obtenues avec l'ADN traité par les ultrasons est représentée sur la figure 1. On y constate que dans la zone d'excès d'anticorps et

TABLEAU I. — Traitements préalables de l'ADN n'entraînant pas de modifications des réactions immunologiques avec les sérums de L. E. D.

TRAITEMENT	DUREE en MINUTES	VISCOSITE [η] *	INTENSITE * BIREFRINGENCE D'ECOULEMENT
Irradiation UV	20	95%	84%
Formol 10%	1440	90%	80%
Formol 10% et chauffage à 70°C	10	74%	50%
Ultrasons (sous H ₂)	5	3%	6,5%
Ultrasons (sous H ₂)	60	3%	4,8%
Chauffage à 85° C à pH 7	15		
Chauffage à 100°C à pH 7	20	4%	5%
Alcalinisation par NaOH à pH 12,1 à 20°C	15	7%	5%
Idem puis chauffage à 80°C	15	4%	4%
Alcalinisation par NaOH à pH 12,9 à 20°C	15		
Idem puis chauffage à 37°C	120		
Acidification par HCl à pH 1,5 à 20° C	15	18%	12%

* Les résultats sont exprimés en p. 100 des résultats obtenus avec le même ADN avant tout traitement.

dans la zone d'équivalence, la courbe est superposable à celle obtenue avec l'ADN non modifié, tandis que, dans la zone d'excès d'antigène, la courbe de l'ADN traité par les ultrasons descend plus vite. Une courbe analogue à celle de la figure 1 a été obtenue en faisant réagir les mêmes échantillons d'ADN avec un autre sérum de L. E. D. plus riche en anticorps (point d'équivalence à 20 µg d'ADN non modifié). Cet ADN traité par les ultrasons était précipité par l'acide perchlorique 0,5 N dans la proportion de 94 p. 100. Le poids moléculaire moyen de ces fragments d'ADN serait de l'ordre de 300 000 [20].

II. — RÉACTIONS AVEC L'ADN ACIDIFIÉ PUIS CHAUFFÉ.

Comme on le voit sur le tableau II (2) l'ADN porté à pH 7 par l'acide chlorhydrique puis maintenu à 37° C pendant des délais de plus en plus longs, perd peu à peu sa capacité de réagir avec les anticorps du L. E. D. Après vingt-quatre heures de séjour à

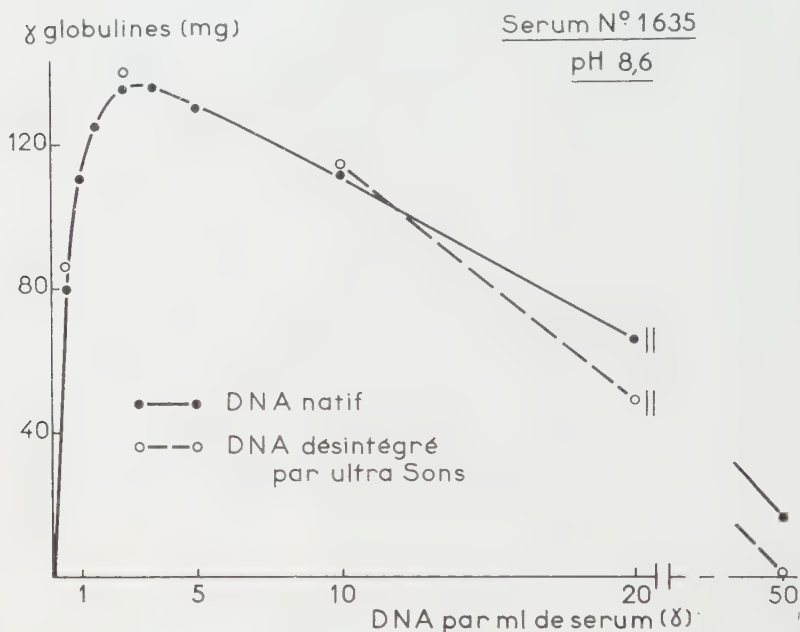


FIG. 1. — Erratum : Au lieu de : γ -globulines (mg), lire : γ -globulines (μ g).

37° C, l'ADN ainsi traité ne réagit plus avec les anticorps (3). Cet échantillon est dépourvu de bases puriques et ne précipite pas par l'acide perchlorique 0,5 N. Son poids moléculaire moyen serait

(2) Tous les échantillons étudiés dans les tableaux II et III donnent des viscosités inférieures à 3 p. 100 de celles du témoin ce qui, pour les concentrations en ADN de nos solutions, se trouve à la limite de précision des mesures.

(3) Pour un seul sérum, nous avons obtenu avec un tel échantillon un « ring-test » positif mais pas d'épuisement. Nous ne disposions plus de ce sérum pour répéter l'expérience et, avec trois autres sérums, ce résultat ne s'est jamais reproduit.

de l'ordre de 15 000 tel que Tamm et Chargaff l'ont déterminé pour des préparations analogues [21]. On remarquera sur le tableau II : a) que même des échantillons contenant encore un pourcentage appréciable de produits précipitant par l'acide perchlorique ne réagissent plus avec les anticorps ; b) qu'il existe un certain parallélisme entre la perte des bases puriques et la perte de capacité de réaction avec les anticorps.

III. — RÉACTIONS AVEC L'ADN TRAITÉ PAR LA DÉSOXYRIBONUCLÉASE.

Le tableau III (2) montre qu'un traitement par une très faible quantité de DNase est encore compatible avec des réactions immunologiques normales. Mais, avec des quantités plus importantes de DNase, la capacité de réagir avec les anticorps disparaît peu à peu. Les produits terminaux de la dégradation enzymatique sont incapables d'inhiber la réaction de l'ADN non modifié, même si on utilise un très large excès de ces produits.

IV. — AUTRES EXPÉRIENCES.

1° Grâce à l'obligeance du D^r P. Schaeffer, nous avons pu montrer que l'ADN, extrait par Sinsheimer du phage ϕ X 174 [22], qui ne comporte qu'une seule chaîne, donne des réactions de précipitation et de fixation du complément positives avec différents sérums de L. E. D. Nous possédions une trop faible quantité de cet ADN pour pouvoir effectuer des expériences quantitatives.

2° Nous avons ajouté à 1 ml d'un sérum de L. E. D. (dont les anticorps précipitants peuvent être épuisés par 8 μ g d'ADN) 150 μ g de chacune des bases suivantes : thymine, adénine, guanine, ou bien 8 mg de chacun des nucléosides suivants : désoxyriboadénosine, désoxyriboguanosine, désoxyribothymidine et désoxyribocytidine. Dans aucune de ces expériences, nous n'avons observé une inhibition de la réaction avec l'ADN non modifié.

3° L'acide ribonucléique ne réagit pas avec les sérums de L. E. D. Il n'est pas inhibiteur des réactions avec l'ADN : ces réactions ne sont pas modifiées après addition de 8 mg d'acide ribonucléique à 1 ml de différents sérums de L. E. D.

4° L'addition à 1 ml de sérum de L. E. D. de 20 mg d'un polyphosphate de sodium de structure linéaire ayant une longueur de chaîne moyenne de 25 groupements phosphate (4) n'inhibe pas non plus les réactions de l'ADN.

(4) Nous remercions M. Ebel, de Strasbourg, qui a bien voulu nous donner cet échantillon de polyphosphate.

TABLEAU II. — Réactions avec l'ADN acidifié puis chauffé.

ADN porté à pH	Chauffé à	% de précipitation par ClO_4H 0,5N	% Bases puriques détachées **	R é a c t i o n s avec S é r u m s de L.E.D.		
				Précipitation (Ring-Test)	Fixation complé- ment	Neutralisation des anticorps précipitants avec * Inhibition des anticorps précipitants avec*
1,7	37°C			++	++	1 x n
1,7	37°C	97%	11%	++	++	1,5 x n
1,7	37°C	94%		++	++	2 x n
1,7	37°C	90%		++	++	3 x n
1,7	37°C	86%	18%	++	++	4 x n
1,7	37°C	82%		++	++	4 x n
1,7	30°C	80%		++	++	4 x n
1,7	37°C	72%	40%	(+)	(+)	6 x n
1,7	37°C			-	-	30 x n
1,9	24h.	36%		(+)	+	15 x n
2,1	24h.	34%	62%	+	+	20 x n
1,7	30°C	24%	98%	-	-	80 x n***
1,7	37°C	3%	100%	-	-	80 x n***
1,7	37°C	0		-	-	80 x n***
1,5	30h.			-	-	
	15min.			-	-	

* On a indiqué la quantité minima d'ADN ainsi modifié nécessaire pour absorber (ou inhiber) tous les anticorps précipitants de 1 ml de sérum, n étant la quantité minima d'ADN non modifié nécessaire pour absorber ces anticorps. ** Voir texte Techniques. *** Dans ces cas, on n'observe pas d'inhibition.

TABLEAU III. — Réactions avec l'ADN traité par la désoxiribonucléase.

DNase $\mu\text{g/ml}$ **	Délai (à 21,5°C) en heures	% de précipitation par ClO_4H 0,5N	R é a c t i o n s a v e c S é r u m s d e L . E . D .		
			Précipitation (Ring-Test)	Fixation complément	Inhibition des anticorps précipitants avec *
0,05	48	75%	++	++	1 x n
0,1	22	55%	++	++	1 x n
0,2	4	61%	++	++	1 x n
0,2	7	55%	+	+	1 x n
0,8	1	50%	++	+	1,5 x n
0,4	2	32%	+	+	2 x n
0,8	2	19%	+	(+)	15 x n
0,8	7	0	-	-	50 x n ***
50 ****	3	0	-	-	500 x n ***

* On a indiqué la quantité minima d'ADN ainsi modifié nécessaire pour absorber (ou inhiber) tous les anticorps précipitants de 1 ml de sérum, *n* étant la quantité minima d'ADN *non modifié* nécessaire pour absorber ces anticorps. ** La concentration en ADN était de 320 $\mu\text{g/ml}$. *** Dans ces cas, on n'observe pas d'inhibition. **** Dans ce cas, la concentration en ADN était de 1 750 $\mu\text{g/ml}$ et la température de 25°C.

DISCUSSION

Le but essentiel de cette étude était d'essayer de préciser les groupements déterminants (sites réactifs) de la molécule d'ADN réagissant avec les anticorps présents dans le sérum de L. E. D.

Lors de nos expériences initiales [41], nous avons été frappés par le fait que l'ADN, soumis, même pendant un long délai, à l'action des ultrasons, réagissait encore normalement avec les anticorps du L. E. D., alors que ces anticorps ne réagissaient plus avec l'ADN traité par la désoxyribonucléase. Comme la scission de l'ADN sous l'influence des ultrasons se produit par rupture simultanée de liaisons de covalence situées au même niveau dans les deux chaînes polynucléotidiques, sans que celles-ci se séparent [21, 23], nous en avons déduit que la persistance de l'enroulement spécifique des deux chaînes du modèle de structure de Watson et Crick [24, 25] était probablement nécessaire pour que l'anticorps puisse réagir.

Les nouvelles expériences rapportées ici prouvent que cette hypothèse était inexacte. En effet, après chauffage à 100° C pendant vingt minutes et refroidissement rapide, l'ADN a perdu sa structure à deux chaînes [26]. De même, après alcalinisation à pH 12,1 ou 12,9 et après acidification à pH 1,5, les ponts hydrogènes sont rompus et les chaînes nucléotidiques peuvent se séparer. Or l'ADN soumis à ces divers traitements réagit encore normalement avec les sérums de L. E. D. et il importe de souligner qu'il s'agit là de modifications considérables de l'ADN. Le fait que la *structure hélicoïdale en double chaîne n'intervient pas dans la réaction* avec les anticorps du L. E. D. est formellement confirmé, puisque nous avons constaté que ces anticorps réagissent avec l'ADN extrait par Sinsheimer du phage ϕ X 174 ; or cet ADN ne comporte qu'une seule chaîne [22].

Les produits de dégradation obtenus après chauffage prolongé en milieu acide ou après action de la DNase à forte concentration ne sont pas capables de se combiner avec les anticorps, puisque nous n'avons observé aucune réaction d'inhibition avec ces produits, même en large excès. On peut en conclure qu'un seul mononucléotide ne comprend pas la configuration d'un site réactif. Ceci laissait prévoir, et l'expérience l'a confirmé, que les constituants de chacun des mononucléotides (nucléosides, désoxyribose, bases puriques ou pyrimidiques) ne réagissent pas, isolément, avec les anticorps du L. E. D. Le(s) site(s) réactif(s) des anticorps du L. E. D. doivent donc correspondre à un groupe d'au moins deux nucléotides.

Les expériences que nous avons effectuées ne permettent pas de préciser la taille de la plus courte chaîne polynucléotidique

encore capable de donner une réaction avec les anticorps du L. E. D. Nous savons seulement que des fragments d'ADN contenant environ 600 nucléotides réagissent normalement avec les anticorps du L. E. D. ; telle est, en effet, la longueur approximative des produits obtenus après une action prolongée des ultrasons [20]. Mais le nombre considérable d'anticorps fixés par une molécule d'ADN [41 bis] suggère que le(s) site(s) réactif(s) implique un petit nombre de nucléotides et se répète un grand nombre de fois dans la molécule d'ADN. En outre, certaines de nos expériences permettent de penser que la longueur de la chaîne polynucléotidique n'est pas à elle seule suffisante pour que la réaction se produise. En effet, a) dans certaines conditions (voir tableau II), des produits de dégradation de l'ADN encore précipitables par l'acide perchlorique ne réagissent plus avec les anticorps ; b) les produits d'hydrolyse acide de l'ADN obtenus après séjour prolongé à 37° C ne réagissent plus avec les anticorps ; or ils ne traversent pas le sac de dialyse et auraient un poids moléculaire moyen de l'ordre de 15 000 [21], ce qui correspond à une chaîne d'environ 50 nucléotides. Mais ces polynucléotides ont perdu toutes leurs bases puriques. La chaîne de polydésoxyribose phosphate qui subsiste n'intervient donc pas dans la réaction immunologique et c'est peut-être l'absence des bases puriques qui est responsable de l'incapacité de se combiner aux anticorps.

Ainsi, les bases puriques pourraient faire partie du ou des sites réactifs des anticorps du L. E. D. Mais, comme nous l'avons dit plus haut, les bases puriques ne peuvent pas à elles seules correspondre au(x) site(s) réactif(s). Puisque l'acide ribonucléique ne réagit pas avec les anticorps, on peut penser que le désoxyribose normalement attaché aux bases puriques ou pyrimidiques interviendrait dans la réaction. On peut donc envisager l'hypothèse suivante : *le(s) site(s) réactif(s) pourraient comprendre les bases et les molécules de désoxyribose d'au moins deux nucléotides voisins sur une seule chaîne polynucléotidique.*

On pourrait invoquer à l'encontre de cette hypothèse le fait que certains oligonucléotides n'inhibent pas la réaction avec l'anticorps. Il s'agit notamment de ceux présents dans l'hydrolysat obtenu après action prolongée de la DNase.

Deux interprétations au moins pourraient concilier ce fait expérimental et l'hypothèse que nous avons émise : a) la forte charge négative des acides phosphoriques monoestérifiés présents en bout de chaîne sur ces oligonucléotides pourrait exercer une répulsion sur l'anticorps ; b) la nature de la séquence des bases comprises dans le site réactif pourrait ne pas être indifférente et il faudrait alors admettre que la désoxyribonucléase a préférentiellement coupé les séquences correspondant aux sites réactifs. On sait d'ailleurs qu'une hydrolyse préférentielle est réalisée lors

de l'action de certaines protéases et de la nucléase du *Micrococcus* [27].

Nos résultats ne permettent de préciser ni la longueur exacte de la chaîne polynucléotidique intervenant dans la réaction, ni la nature de la séquence nucléotidique intéressée. Ces précisions pourraient être apportées en étudiant de façon systématique l'éventuelle action inhibitrice d'oligonucléotides de longueur et de structure connues.

RÉSUMÉ.

Pour essayer de préciser la nature des groupements spécifiques de la molécule d'ADN avec lesquels réagissent les anticorps anti-ADN du sérum de lupus, nous avons étudié les réactions de précipitation, de fixation du complément et de neutralisation de ces anticorps avec des ADN diversement dégradés et dénaturés.

Il ressort de cette étude : 1° que des ADN considérablement modifiés réagissent encore avec les anticorps du lupus ; 2° que la structure hélicoidale en double chaîne de l'ADN n'intervient pas dans la réaction ; 3° que le(s) site(s) réactif(s) doit correspondre à un groupe d'au moins 2 nucléotides.

Les résultats actuels ne permettent pas de préciser la longueur minima de la chaîne polynucléotidique intervenant dans la réaction. Ils suggèrent que le ou les sites réactifs pourraient comprendre les bases et les molécules de désoxyribose d'au moins 2 nucléotides voisins sur une seule chaîne polynucléotidique.

SUMMARY

REACTIONS BETWEEN ANTI-DNA ANTIBODIES FROM SERUM OF PATIENTS WITH DISSEMINATED LUPUS ERYTHEMATOSUS AND DENATURED OR DEGRADED DNA.

An investigation on the nature of the specific groups of the DNA molecule which react with the anti-DNA antibodies of lupus sera was performed by studying precipitin reaction, complement fixation and neutralization of these antibodies, with degraded and denatured DNA.

It was concluded from these studies that : 1. Considerably modified DNA still reacts with the lupus antibodies. 2. The double helix structure of DNA does not take part in the reaction. 3. The reactive site (or sites) on the DNA is composed of at least 2 nucleotides.

The minimum length of the polynucleotidic chain which takes part in the reaction cannot be precisely determined from the present results. These results suggest that the reactive site or sites could include the basis and the desoxyribose molecules of at least 2 neighbouring nucleotides on a single polynucleotidic chain.

*
**

Nous remercions vivement M. P. Grabar pour les précieux conseils qu'il nous a donnés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SELIGMANN (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 243.
- [2] SELIGMANN (M.) et MILGROM (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 1472.
- [3] CEPPELLINI (R.), POLLI (E.) et CELADA (F.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1957, **96**, 572.
- [4] ROBBINS (W. V.), HOLMAN (H. R.), DEICHER (H.) et KUNKEL (H. G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1957, **96**, 575.
- [5] DEICHER (H. R. G.), HOLMAN (H. R.) et KUNKEL (H. G.). *J. exp. Med.*, 1959, **109**, 97.
- [6] HIJMAN (W.) et SCHUIT (H. R. E.). *Vox sanguinis*, 1959, **4**, 376.
- [7] PEARSON (C. M.), CRADDOCK (C. G.) et SIMMONS (N. S.). *J. Lab. Clin. Med.*, 1958, **52**, 580.
- [8] MIESCHER (P.) et STRASSLE (R.). *Vox sang.*, 1957, **2**, 282.
- [9] DEICHER (H. R.), HOLMAN (H. R.), KUNKEL (H. G.) et OVARY (Z.). *J. Immunol.*, 1960, **84**, 106.
- [10] CHRISTIAN (C. I.), MENDEZ-BRYAN (R.) et LARSON (B. L.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1958, **98**, 820.
- [10 bis] BOZICEVICH (J.), NASOU (J. P.) et KAYHOE (D. E.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1960, **103**, 636.
- [11] SELIGMANN (M.). *Rev. Franç. Et. clin. biol.*, 1958, **3**, 558.
- [11 bis] SELIGMANN (M.) et ALAIS (L.). *Biochim. Biophys. Acta* (à paraître).
- [12] BARBU (E.) et PANIJEL (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 1382.
- [13] SCHWANDER (H.) et SIGNER (R.). *Helv. Chim. Acta*, 1950, **33**, 1521.
- [14] BARBU (E.) et JOLY (M.). *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1956, **65**, 17.
- [15] SCHUSTER (H.), SCHRAMM (G.) et ZILLIG (W.). *Z. Naturforsch.*, 1956, **11B**, 339.
- [16] BARBU (E.) et JOLY (M.). *J. Chim. Phys.*, 1956, **53**, 951.
- [17] MC DUFFIE (F. C.) et KABAT (E. A.). *J. Immunol.*, 1956, **77**, 193.
- [18] LOWRY (O. H.), ROSEBROUGH (N. J.), FARR (A. L.) et RANDALL (R. J.). *J. biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.
- [19] WADSWORTH. *Standards Methods of N. Y. State Dept.*, 361.
- [20] DOTY (P.), MCGILL (B. B.) et RICE (S. A.). *Proc. nat. Acad. Sci. U. S.*, 1958, **44**, 432.
- [21] TAMM (C.) et CHARGAFF (E.). *J. biol. Chem.*, 1953, **203**, 689.
- [22] SINSHEIMER (R. L.). *J. molecular Biol.*, 1959, **1**, 43.
- [23] HALL (C.) et LITT (M.). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1958, **4**, 1.
- [24] WATSON (J. D.) et CRICK (F. H.). *Nature*, 1953, **171**, 737.
- [25] CRICK (F. H.) et WATSON (J. D.). *Proc. Royal Soc. London*, 1954, **A223**, 80.
- [26] DOTY (P.), MARMUR (J.), EIGNER (J.) et SCHILDKRAUT (C.). *Proc. nat. Acad. Sci., U. S.*, 1960, **46**, 461.
- [27] RUSHIZKY (G. W.), KNIGHT (C. A.), ROBERTS (W. K.) et DEKKER (C. A.). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1960, **2**, 153.

SUPPRESSION DU POUVOIR INHIBITEUR DU FER SUR LA TOXINOGENÈSE DIPHTÉRIQUE PAR LA LEVURE (EFFET LEVURE)

par J. E. ALOUF et M. RAYNAUD (*).

*(Service de Biochimie bactérienne,
Institut Pasteur, Annexe de Garches [S.-et-O.]*

De nombreux travaux effectués depuis une trentaine d'années ont montré la dépendance étroite entre le taux de fer d'un milieu dans lequel se développe le bacille diphtérique et l'excrétion par le bacille de l'exotoxine spécifique correspondante : la toxine diphtérique [1, 2, 3, 4, 22, 23, 24, 25].

Actuellement on sait que l'optimum de toxinogénèse est obtenu pour une concentration en fer de l'ordre de 100 à 150 μg par litre. Pour des concentrations plus basses, la toxinogénèse et la croissance sont plus faibles. Par contre, au-delà de l'optimum la croissance continue à être stimulée, tandis que la toxinogénèse décroît et finit par être négligeable. (< 5 Lf/ml pour la souche Park Williams n°8 hautement toxigène et utilisée pour la production de toxine) pour une concentration en fer de 500 μg par litre. Parallèlement à l'augmentation puis à la diminution de l'excrétion de toxine en fonction du taux de fer, la coproporphyrine III qui accompagne la toxine dans le milieu suit la même évolution [4].

Ce travail a pour but de présenter un phénomène inédit que nous avons constaté et pour lequel nous proposons le terme d'« effet levure ».

Lors de la préparation d'un milieu à base de viande décrit plus loin pour la culture du bacille diphtérique, nous avons à plusieurs reprises constaté la suppression de l'effet inhibiteur du fer lorsqu'on ajoutait de la levure de boulangerie au milieu. On obtenait dans ce cas des taux élevés de toxine en présence de concentrations nettement inhibitrices de fer (1 000 μg). Si, par contre, le milieu

(*) Société de Microbiologie, séance du 2 juin 1960.

contenant la suspension de levure était centrifugé avant son ensemencement pour éliminer la levure, nous n'obtenions plus dans ce cas que des taux très bas et souvent nuls de toxine.

Nous avons constaté que le même phénomène pouvait être reproduit en milieu synthétique (fig. 1).

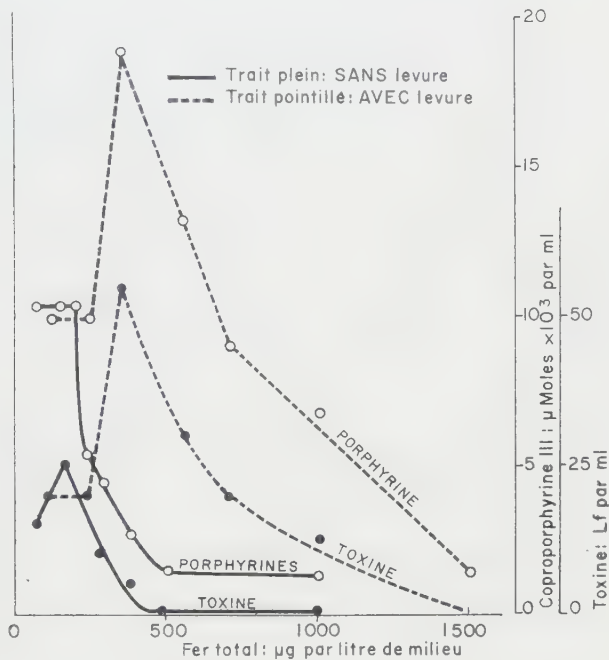


FIG. 1. — Action d'une suspension de levures tuées sur l'excrétion de la toxine et des porphyrines par *C. diphtheriae* en milieu de culture agité synthétique en fonction du taux de fer.

MÉTHODES.

1° Milieux de culture.

a) *Milieu complexe R. A. P, modifié* [5]. — Dans une grande cuve on chauffe doucement pour amener à la température de 85° en une heure le mélange suivant :

Viande de cheval dégraissée	225 g
Eau	1 000 ml
Papaïne brute	2 g

On filtre sur papier mou et on ajuste à $\text{pH} = 8,4$ avec de la lessive de soude. On ajoute 5 g de levures fraîches de boulangerie, et on chauffe le mélange à 90° pendant quinze minutes. On filtre sur papier dur, et on ajuste le pH à 8,4. On ajoute 5 g d'acétate de sodium. On répartit et on stérilise à l'autoclave à 112° , pendant trente minutes.

Après refroidissement on ajoute stérilement une solution de maltose stérile à 50 p. 100. Le taux optimum de maltose est de 10 g par litre. Le milieu présente un léger trouble dû à la présence de la levure.

b) *Milieu synthétique Yoneda-Alouf.* — Ce milieu décrit précédemment [4, 6] comprend trois acides aminés (acide glutamique, méthionine et cystine), des acides organiques (lactique et succinique), des sels minéraux, des oligo-éléments métalliques (solution II de Mueller et Miller [7]), des facteurs de croissance (solution III de Mueller et Miller) et du maltose.

2° Souches utilisées et conditions de culture.

Sur milieu RAP nous cultivons la souche Park Williams n° 8 Toronto. En tubes agités nous obtenons après quarante-huit heures de culture 50 à 70 Lf de toxine par millilitre. La taux résiduel de fer sur ce milieu est de 400 à 500 μg par litre. La culture est effectuée sans addition de fer au milieu.

Sur milieu synthétique nous cultivons un mutant dérivé de la souche P. W. n° 8 (souche Garches) adapté à ce milieu et dont nous avons décrit précédemment le mode d'obtention [6]. L'optimum de toxinogénèse a lieu pour 120 μg de fer ajouté par litre. Le fer résiduel du milieu varie entre 40 et 60 μg par litre. Sur ce milieu nous obtenons régulièrement une toxine titrant 35 à 50 Lf/ml représentant 30 p. 100 environ des protéines totales excrétées dans le milieu.

La culture est effectuée en milieu agité en tubes immergés dans un bain-marie réglé à 34° et selon les modalités déjà décrites [6].

3° Préparation de levures.

a) *Suspension de levures fraîches de boulangerie tuées par la chaleur.*

Nous préparons une suspension mère à 10 p. 100 (en poids humide) de levures fraîches de boulangerie. Cette suspension est effectuée en écrasant dans un mortier avec une solution de phosphate disodique 0,02 M les levures ajoutées par fractions. Le pH final de cette suspension est de 8,0. On chauffe la suspension à 90° pendant quinze minutes et on conserve à la glacière à l'état congelé. Deux suspensions (1 et 2) ont été employées, dont les caractéristiques sont indiquées ci-dessous :

Suspension 1 :

Densité optique à 540 $\text{m}\mu$	17 000
Azote total	2 mg/ml
Poids sec	3,15 p. 100
Fer	3 μg /ml

Suspension 2 :

Densité optique à 540 m μ	16 500
Azote total	2,2 mg/ml
Poids sec	3,4 p. 100
Fer	3,4 μ g/ml

Au moment de l'emploi la suspension-mère est diluée à la concentration voulue avec du milieu (Une préparation de levures desséchées de Delft n'a pas donné de résultats positifs).

b) *Plasmolysat de levures* (Méthode de Sievers et Jännes [8]. — Cette préparation est effectuée en milieu hypertonique amenant la rupture des parois cellulaires de la manière suivante :

Dissoudre 75 g de chlorure de sodium dans 200 ml d'eau. Placer la solution dans un récipient dont la masse est agitée constamment par un agitateur mécanique. Ajouter progressivement 1 200 g de levures fraîches de boulangerie de manière que la plasmolyse se fasse aussitôt et complètement. Placer alors le contenu liquéfié à l'étuve à 37° pendant douze heures. Puis transférer ce mélange dans un bain-marie réglé à 50°, pendant vingt-quatre heures.

Ajouter à la masse ainsi obtenue un égal volume d'eau et centrifuger à 3 000 t/m pendant trente minutes. Eliminer le culot ; on obtient environ 1 l de surnageant. Filtrer sur filtre stérilisant, recueillir en flacons stériles et conserver à la glacière jusqu'à emploi.

La solution jaune limpide que nous avons utilisée avait un pH = 6,5 et contenait 2,25 mg d'azote total et 3,5 μ g de fer par millilitre.

c) *Cendres de levures*. — On incinère 100 ml de plasmolysat de levures dans une capsule en silice au four électrique pendant cinq heures à la température de 500°, (obtention de cendres blanches). On reprend les cendres par 10 ml d'acide chlorhydrique R. P. 5 N. Evaporer au bain-marie puis incinérer de nouveau. Reprendre les chlorures métalliques de la levure ainsi préparés dans 25 ml d'eau distillée.

1 ml de solution de cendres équivaut à 4 ml de plasmolysat de levures soit 14 μ g de fer/ml.

4° Autres techniques.

La toxine est titrée par floculation selon la méthode classique de Ramon [9]. La croissance bactérienne est mesurée par la détermination de la densité optique des suspensions de germes au photomètre Klett-Summerson à 540 m μ (100 unités Klett correspondant à une densité optique de 0,200).

Le fer est dosé par la méthode à l'ortho-phénanthroline de Jackson [40] modifiée par Woitwood [41].

Les porphyrines constituées presque exclusivement (97 p. 100) par la coproporphyrine III [42] sont évaluées au spectrophotomètre Beckmann par l'intensité de la bande de Soret à 403 m μ . A 1 ml de surnageant de culture, on ajoute 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. On place au bain-marie bouillant pendant deux minutes. On refroidit et on complète à 10 ml avec de l'eau distillée. On mesure l'absorption

à 403 m μ . Le coefficient d'absorption moléculaire de la coproporphyrine III dans ces conditions est de $5,3 \cdot 10^5$ selon Joje et O'Brien [43].

Le fer est ajouté dans le milieu sous forme de sulfate ferreux SO_4Fe , $7\text{H}_2\text{O}$ avant stérilisation.

RÉSULTATS.

1° Action de la levure totale.

Dans les tableaux Ia et Ib figurent les résultats obtenus avec le milieu R. A. P. et le milieu synthétique en présence de 5 g de levure (poids humide) par litre. Ce résultat, très net en milieu R. A. P. et en milieu synthétique où l'on obtient 50 Lf en présence

TABLEAU I (a). — Effet levure sur milieu R. A. P. obtenu avec une suspension de levures tuées.

g de Fer ajouté	Avec Levures		Sans Levures	
	par litre	Fer total Lf / ml	Fer total Lf / ml	
0	500	65	350	0
300	800	55	650	0
1000	1500	37	1350	0
2000	2500	30	2350	0
5000	5500	0	5350	0

Conditions expérimentales : Culture agitée en tubes en T à 34° C, volume 10 ml pendant quarante-huit heures. Le taux de fer « résiduel » du milieu (350 μg par litre) est suffisant pour inhiber la toxinogénèse complètement en l'absence de levure. Ce milieu complexe n'est donc capable de donner de la toxine que grâce à la présence de la levure. Quantité de levure employée : 5 g (poids humide) par litre. On a ajouté à 10 ml de milieu 0,5 ml de la suspension mère dont les caractères sont rapportés plus haut : 0,5 ml : 1 mg N levure ; 1,5 μg de fer.

La levure apporte donc 150 μg de fer supplémentaire par litre.

de 500 μg de fer ajouté sans compter celui amené par la levure, nous a fait penser à la possibilité d'une fixation physique (adsorption) du fer sur les cellules de la levure, ce qui aurait pour effet de l'éliminer du milieu. Il n'en est rien, comme le montrent les résultats figurant au tableau II obtenus par agitation pendant vingt-quatre heures à 34° C de la suspension de levure dans du milieu contenant des concentrations de fer radioactif (^{59}Fe) allant de 500 à 5 000 μg . Les déterminations de la radioactivité sont faites sur

TABLEAU I (b). — Effet levure sur milieu synthétique obtenu avec une suspension de levures tuées.

S a n s L e v u r e s			A v e c L e v u r e s		
Fer total $\mu\text{g/litre}$	Toxine Lf/ml	Copro- porphyrine III $\mu\text{Mx}10^3 \times \text{ml}^{-1}$	Fer total $\mu\text{g/litre}$	Toxine Lf/ml	Copro- porphyrine III $\mu\text{Mx}10^3 \times \text{ml}^{-1}$
70	15	10,3	130	20	9,9
120	20	10,3	250	20	9,8
170	25	10,3	350	60	18,8
220	20	5,4	550	30	13,2
270	10	4,5	700	20	9,0
370	5	2,8	1000	15	6,8
470	non décelable par floculation	1,5	1500	non décelable par floculation	1,4
1000	non décelable par floculation	1,4			

Conditions expérimentales : Culture agitée en tubes en T à 34° C ; volume 10 ml, pendant quarante-huit heures. On a ajouté 0,5 ml d'une suspension de levure (à 10 μg de levures fraîches par ml) qui contenait 3,4 μg de fer par ml. La levure apporte donc 170 μg de fer supplémentaire par litre.

TABLEAU II. — Absence de fixation de ^{59}Fe sur des suspensions en milieu R. A. P. de levures tuées agitées à 34°.

	Activité spécifique des Surnageants $\text{Imp. min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$			
	0 heure	1 heure	3 heures	24 heures
$\mu\text{g Fer / litre}$				
500	74	68	69	67
1000	144	142	133	146
2000	285	280	275	263
5000	697	666	672	491

Conditions expérimentales : activité spécifique mesurée sur les surnageants de centrifugation.

les surnageants après centrifugation. On remarque qu'après vingt-quatre heures il n'y a aucune fixation significative de fer sauf pour la concentration de 5 000 μg où 20 p. 100 du fer ne sont pas retrouvés dans le surnageant. Il faut cependant observer qu'à ce taux très élevé, le fer s'insolubilise en partie par précipitation avec les phosphates du milieu.

TABLEAU III. — Effet levure obtenu avec divers extraits de levure en milieu synthétique.

μg Fer ajouté	Extraits	Toxine (Lf / ml)	Coproporphyrine III $\mu\text{M} \times 10^3 / \text{ml}$
100	-	35	4,8
500	-	0	3,4
500	Extrait " Byla "		
	1 p. mille	10	3,9
500	0,5 "	15	4,3
500	0,1 "	0	0
500	Extrait " Difco "		
	1 p. mille	20	4,6
500	0,5 "	10	4
500	0,1 "	10	4
500	Extrait " IBF "		
	1 p. mille	15	4,3
500	0,5 "	10	3,9
500	0,1 "	5	3,4
100	Plasmolysat		
	(1 ml/10 ml (milieu)	40	8,5
500	"	50	5,8
500	0,5 ml/10 ml	20	4,7
500	0,1 ml/10 ml	10	3,5

L'hypothèse d'une adsorption du fer sur les cellules est d'ailleurs éliminée par l'emploi, non plus de levures entières, mais d'extraits de levure et de plasmolysat de levure, matériels solubles facile à standardiser et que nous avons utilisés dans une série d'expériences.

2° Action des extraits de levure et du plasmolysat de levure.

Les extraits de levure variés que nous avons utilisés ont tous reproduit avec plus ou moins d'intensité l'effet obtenu avec la levure entière. L'effet est proportionnel à la quantité d'extrait présente (tableaux III et IV) dans certaines limites.

TABLEAU IV. — Action comparée de la levure entière, du plasmolysat de levure, et de cendres de levure. Quantification de l'effet levure en milieu synthétique.

μg Fer ajouté par litre	Levures	Croissance (48 h) D. optique	Toxine (Lf / ml)
100		4200	35
500		4400	0
	<u>Levures entières</u>		
100	5 p. mille	6400	25
500	5 "	6600	20
500	1 "	5800	20
500	0,1 "	4800	15
500	0,01 "	4200	10
1000	5 "	7000	25
	<u>Plasmolysat</u>		
100	1 ml p. 10	7000	70
500	1 "	8000	40
500	0,01 "	4000	0
	<u>Sol. de Cendres</u>		
100	0,25 ml	6000	30
500	0,25 ml	8000	20
500	0,10 ml	7000	15

3° Action des cendres de levure.

L'hypothèse la plus simple pour expliquer l'effet levure est celle d'effets antagonistes du fer dus à l'action des divers ions métalliques se trouvant dans la levure. Les cendres de levure (tableau IV) nous ont permis effectivement de retrouver partiellement l'effet produit par les levures entières.

4° Action de divers métaux divalents.

L'effet partiel de suppression du pouvoir inhibiteur du fer par les cendres impliquait la participation de divers métaux. Nishida a signalé, antérieurement à nous-mêmes, un effet supprimeur du cuivre [14]. Nous avons pu vérifier l'exactitude de cette observation.

Dans le tableau V figurent les résultats obtenus avec les métaux

TABLEAU V. — Actions des ions métalliques divalents sur la toxino-génèse et l'excrétion des porphyrines extracellulaires en présence de 500 μg de fer par litre.

μg / litre	Croissance en fin de culture (Densité optique)	Toxine Lf / ml	Coproporphyrine III $\mu\text{M} \times 10^3 / \text{ml}$
Cu ++	100	6000	12
	500	7400	25
	1000	7200	20
	2000	7400	22
	5000	7400	0
Zn ++	100	6800	12
	500	6200	15
	1000	6000	0
Ni ++	500	6400	20
	1000	6200	15
Mn ++	100	6800	0
	500	6000	0
	1000	5400	0
Co ++	100	6200	0
	500	6000	0
	1000	6000	0
Témoin Fer seul 500 μg / litre	6400	0	

divalents suivants : Cu^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Mn^{++} et Co^{++} . On constate que le cuivre, le zinc et le nickel ont une action nettement positive, puisqu'ils rétablissent la toxino-génèse (à 50 p. 100 environ) en présence de 500 μg de fer. Leur action semble optima vers 500 μg par litre. Par contre, le manganèse et le cobalt n'ont aucun effet. Les trois métaux « actifs », ensemble ou combinés deux à deux, n'ont pas manifesté un effet synergique.

Cependant l'effet levure ne peut pas s'expliquer uniquement par l'action d'ions métalliques. Nous avons pu vérifier par exemple que le mélange glycine et vitamine B_{12} a un effet analogue. La glycine seule est sans effet. La vitamine B_{12} a une certaine action. Glycine et vitamine B_{12} associées sont très actives (tableau VI).

TABLEAU VI. — Action de la glycine et de la cyanocobalamine sur la toxino-génèse.

Fer ajouté μg / litre	Cyano- cobalamine μg / litre	Glycine μg / litre	Toxine Lf / ml	Copro- porphyrine III $\text{M} \times 10^3$ / ml
100	0	0	40	9,0
100	100	0	45	11,3
100	1000	0	35	9,0
100	0	100	35	7,7
100	0	500	35	6,9
100	1000	500	40	8,9
500	0	0	0	1,3
500	100	0	15	1,5
500	1000	0	15	1,1
500	0	100	0	1,3
500	0	500	0	1,3
500	1000	500	35	4,1

DISCUSSION.

Les résultats que nous venons de rapporter démontrent que l'action inhibitrice du fer sur la toxino-génèse diphtérique peut être partiellement supprimée par certaines substances de nature très diverse :

1° Levures de boulangerie : cellules tuées et extraits solubles.

2° Certains ions divalents : Cu^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} .

3° L'association vitamine B_{12} + glycine.

La sécrétion de coproporphyrine III est parallèle à celle de la toxine, diminuant avec elle lors de l'inhibition par excès de fer. Lorsque cette inhibition est supprimée par certaines des substances ci-dessus, le parallélisme entre le taux de toxine et celui de la coproporphyrine est beaucoup moins net.

Nous considérons que ces diverses substances, bien qu'elles puissent rétablir la toxinogénèse pour des concentrations de fer sûrement inhibitrices en leur absence, ne réalisent qu'une levée partielle de l'inhibition, pour la raison suivante : la toxinogénèse reste toujours sensible à l'influence du fer, même en leur présence ; il faut seulement beaucoup plus de fer pour inhiber la formation de toxine lorsqu'on ajoute ces substances au milieu.

Cette observation évoque l'idée d'une action compétitive entre le fer et les substances actives présentes dans la levure.

Avec les ions divalents, on peut supprimer l'action inhibitrice du fer, mais les taux de toxine atteints en milieu synthétique restent modérés. La levure et le plasmolysat de levure semblent donc apporter des facteurs qui augmentent le taux final de toxine et dont l'action s'ajoute à celle des éléments antagonistes du fer, éléments directement responsables de « l'effet levure ».

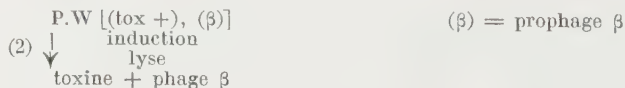
L'interprétation de ce phénomène est donc certainement difficile. Elle ne sera possible que lorsque le mécanisme de l'action inhibitrice du fer sur la toxinogénèse sera mieux connu.

On sait que la production de toxine par une souche donnée de bacille diphtérique est liée à la présence d'un prophage particulier [45, 46]. La souche Park Williams n° 8 et ses diverses variantes toxigènes sont toutes lysogènes portant le prophage particulier (β) associé à la formation de toxine.

Barksdale [47] a présenté une interprétation générale de la relation entre phage et toxine. Cet auteur [48] a montré qu'une souche non toxigène (C_4) sensible au phage virulent B, peut produire de la toxine lorsqu'elle est lysée par ce phage (1).



Il admet que la formation de toxine par une souche lysogène portant le prophage (β), comme la souche Park Williams n° 8, est due à une série de lyses partielles résultant de la transformation du prophage en phage actif (2).



Au cours de la croissance de la souche Park Williams n° 8 dans

une enceinte déterminée à partir d'un inoculum donné, en présence d'un excès de fer, il n'y aurait jamais qu'une proportion faible de transformations spontanées de prophage en phage. Cette proportion faible rend compte du faible taux de toxine trouvé dans toutes ces cultures, même en excès de fer.

Si la croissance s'effectue avec un taux limité de fer (ici 150 μ g) lorsque tout le fer disponible a été consommé, il se produit un ralentissement de la croissance par épuisement du fer d'une part. D'autre part, lorsque les bactéries se développent en l'absence ou en présence d'un taux insuffisant de fer, la fréquence des inductions du prophage en phage actif augmenterait. L'absence ou la réduction du taux de fer agirait en diminuant le taux de catalase (ou de

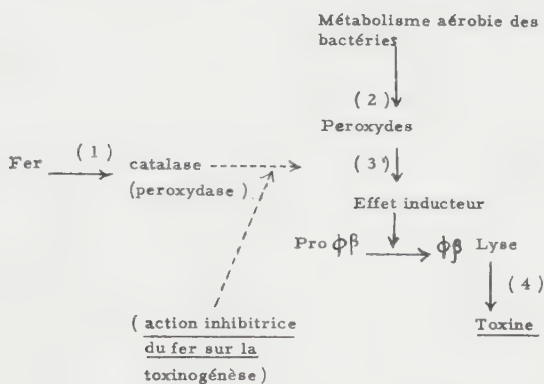


SCHÉMA I.

peroxydase). Il en résulterait une augmentation du taux des peroxydes qui sont des agents inducteurs de la transformation des prophages en phages [19].

L'effet inhibiteur du fer dans cette conception comporte donc l'intervention d'un mécanisme très complexe, qui est résumé dans le schéma I.

Les diverses substances que nous avons trouvées capables de supprimer l'action inhibitrice du fer dans la toxino-genèse, peuvent donc intervenir à des *niveaux très différents*.

On peut par exemple supposer que le cuivre modifie le taux des catalases et des peroxydases (intervention du cuivre dans la synthèse des systèmes hématiniques), ou qu'il agit en augmentant la formation de peroxydes à partir des thiols [20], etc., ou par ces deux mécanismes, etc.

Mais ce schéma, qui a l'avantage de fournir une explication

cohérente et qui rattache l'action du fer à celle du prophage, n'est pas encore établi en toute certitude.

On sait que Pappenheimer [21] a fourni une interprétation toute différente (schéma II).

Dans cette conception, l'effet levure ne peut s'expliquer que par intervention des diverses substances qui le présentent à un *même niveau*. Elles doivent *réduire* ou supprimer la réaction (1).

Il est difficile de trouver des conditions expérimentales simples qui permettent de préciser le mécanisme de l'action inhibitrice du fer en utilisant le système très complexe représenté par une culture de la souche lysogène Park Williams n° 8 sur un milieu donné.

En effet si le schéma I est exact, on voit que le nombre des facteurs à contrôler, en ne faisant varier que le taux de fer, est

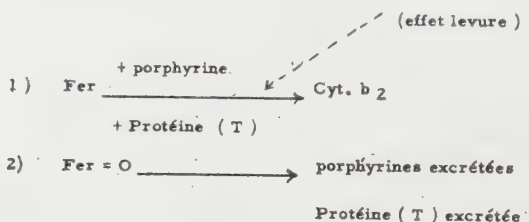


SCHÉMA II.

très élevé. Il est en effet possible que le fer intervienne aussi dans les réactions (2), (3), (4).

Nous pensons, par contre, que le système décrit par Barksdale [18] se prête beaucoup mieux à l'analyse de la toxino-génèse diphtérique, et nous nous proposons d'étudier le rôle du fer et le mécanisme de l'effet levure sur ce système qui devrait fournir des réponses nettes dépourvues de toute ambiguïté.

CONCLUSIONS.

En milieu complexe, comme en milieu synthétique l'addition de levures entières, tuées par la chaleur, ou de plasmolysat préparé par lyse en milieu hypertonique permet une toxino-génèse normale par le bacille diphtérique en présence de concentrations en fer habituellement inhibitrices (500 à 2 000 μg par litre). L'optimum de fer pour la toxino-génèse, qui est normalement de 100 μg , est déplacé vers des concentrations trois à cinq fois supérieures. La porphyrinogénèse est, elle aussi, maintenue. Les cendres de la levure ainsi que certains ions métalliques (Cu^{++} , Zn^{++} , Ni^{++}) et le mélange de glycine et de vitamine B_{12} redonnent partiellement cet effet que nous appelons « effet levure ».

L'explication de cet effet ainsi que le rôle du fer dans la toxino-génèse ne pourront être établis clairement que lorsqu'on connaîtra la relation précise entre la toxino-génèse et la lysogénie pour le prophage β , ou l'infection par le phage B du bacille diphtérique.

SUMMARY

SUPPRESSION OF THE INHIBITORY EFFECT OF IRON ON DIPHTHERIA TOXINOGENESIS BY YEAST (« YEAST EFFECT »).

The adjunction of heat-killed baker yeasts or plasmolysates of yeast obtained by lysis in hypertonic solution, to complex or synthetic media permits a normal toxinogenesis by diphtheria bacillus for high iron concentrations (500 to 2 000 $\mu\text{g/liter}$).

In absence of yeast these concentrations are completely inhibitory for diphtheria toxin synthesis; the optimum level for toxinogenesis occurs for 100-150 μg of iron per liter. In presence of yeast preparations, the optimum level is displaced toward iron concentrations three to five fold higher. The coproporphyrin III production is maintained comparatively to toxin synthesis.

Yeast ashes, some metallic ions (Cu^{++} , Zn^{++} , Ni^{++}) and the mixture of glycine and cyanocobalamine give in part the « Yeast effect ».

The explanation of this effect cannot be clearly established without the previous knowledge of the precise relation between diphtheria toxinogenesis and the lysogeny of the bacillus by prophage β or the infection by phage B.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PAPPENHEIMER (A. M. Jr). *J. biol. Chem.*, 1947, **167**, 251.
- [2] CLARKE (G. D.). *J. gen. Microbiol.*, 1958, **18**, 698.
- [3] YONEDA (M.) et PAPPENHEIMER (A. M. Jr). *J. Bact.*, 1957, **74**, 256.
- [4] ALOUF (J.). Etude physiologique et biochimique de la toxino-génèse diphtérique. *Thèse Doct. Etat Pharm.*, Paris, 1958.
- [5] RAMON (G.), AMOUREUX (G.) et POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 162.
- [6] RAYNAUD (M.), ALOUF (J.) et MANGALO (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 276.
- [7] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.) *J. Immunol.*, 1941, **40**, 21.
- [8] SIEVERS et JANNES (L.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1943, 1943, **22**, 201.
- [9] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 661 et 813.
- [10] JACKSON (S. H.). *Ind. Eng. Chem. Anal. ed.*, 1938, **10**, 302.
- [11] WOJWOD (A. S.). *Biochem. J.*, 1947, **41**, 39.
- [12] GRAY (C. H.) et HOLT (L. B.). *Biochem. J.*, 1948, **43**, 191.
- [13] JOPE (E. M.) et O'BRIEN (J. R. P.). *Biochem. J.*, 1945, **39**, 239.

- [14] NISHIDA (L.) (communication personnelle).
 - [15] FREEMAN (V.). *J. Bact.*, 1951, **61**, 675.
 - [16] GROMAN (N. B.). *J. Bact.*, 1955, **69**, 9.
 - [17] BARKSDALE (L.). *Bact. Rev.*, 1959, **23**, 202.
 - [18] BARKSDALE (L.). *J. gen. Microbiol.*, 1958, **18**, X.
 - [19] LWOFF (A.) et JACOB (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2308.
 - [20] LWOFF (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 366.
 - [21] PAPPENHEIMER (A. M. Jr). *J. biol. Chem.*, 1947, **171**, 701.
 - [22] LOCKE (A.) et MAIN (E. R.). *J. infect. Dis.*, 1931, 1931, **48**, 419-435.
 - [23] POPE (C. G.). *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 218.
 - [24] PAPPENHEIMER (A. M. Jr) et JOHNSON (S. J.). *Brit. J. exp. Path.*, 1936, **17**, 335.
 - [25] MUELLER (J. H.). *J. Immunol.*, 1941, **42**, 343.
-

ANTIGÈNES COMMUNS ENTRE LES CANDIDA ET LES SALMONELLA-ARIZONA

par N. AKSOYCAN, L. et S. LE MINOR (*).

(Faculté de Médecine d'Ankara et Institut Pasteur, Paris)

Si les relations antigéniques à l'intérieur du groupe des *Enterobacteriaceae* ont fait l'objet de nombreuses études dont la dernière est celle de Kampelmacher [1], les rapports entre Entérobactéries et levures n'ont été que rarement signalés. Dès 1944, Kauffmann [2] montra l'existence de rapports antigéniques entre *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella hvittingfoss* et *E. coli* O : 11. Puis Flamm et Kunz [3] rapportèrent les relations entre l'antigène O : 7 des *Salmonella* et des levures. Aksoycan et Kauffmann [4] ont confirmé ces résultats en retrouvant chez trois souches de *Candida albicans* une fraction de l'antigène O : 7.

Nous avons, dans ce travail, recherché les rapports antigéniques éventuels entre les sept espèces de *Candida*, d'une part, les antigènes O des *Salmonella* et des *Arizona*, d'autre part.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Les souches de *Candida* nous ont été fournies par le Dr H. Ekmen et proviennent de la collection du Service de Mycologie médicale de l'Université de Duke (U. S. A.). Les souches portent les références suivantes : *C. albicans* 980 Duke (crachat), *C. stellatoidea* 21 Duke (prélèvement vaginal), *C. krusei* 465 Langeron, *C. tropicalis* 21 Duke, *C. parakrusei* 2546, *C. pseudotropicalis* 2543 et *C. guilliermondi* 2547, ces trois dernières étant des souches de l'Université de Columbia.

Les cultures ont été faites sur milieu de Sabouraud en boîtes de Roux. Après deux jours d'incubation à 37°, elles ont été récoltées et lavées trois fois en eau physiologique. Pour immuniser les lapins nous avons préparé une suspension à 2 p. 100 du culot en eau physiologique additionnée de 1 p. 1 000 de formol.

Les lapins (dont nous avons auparavant contrôlé l'absence d'agglutinines dans le sérum) ont été immunisés aux doses de 0,5, 1, 2, 4 cm³ à un jour d'intervalle pendant la première semaine, 1, 2, 4 cm³ à deux jours d'intervalle la deuxième et la troisième semaine. Ils ont été saignés une semaine après la dernière injection.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juin 1960.

Les titres agglutinants de ces sérums vis-à-vis des suspensions formolées homologues sont les suivants :

<i>C. albicans</i>	1/800
<i>C. tropicalis</i>	1/3 200
<i>C. guillermonti</i>	1/3 200
<i>C. pseudotropicalis</i>	1/1 600
<i>C. parakrusei</i>	1/3 200
<i>C. krusei</i>	1/400
<i>C. stellatoidea</i>	1/400

Les souches de *Salmonella* des divers groupes O proviennent toutes du Centre International des *Salmonella* de Copenhague (Prof. Kauffmann). Les sérums O ont été préparés suivant la technique habituelle en injectant aux lapins des suspensions chauffées deux heures à 100° : les injections intraveineuses furent faites à quatre jours d'intervalle, aux doses de 1, 2, 4, 6 milliards et la saignée dix jours après la dernière injection.

Les souches types d'*Arizona* correspondant aux divers groupes O actuellement connus nous ont été fournies par le Dr Edwards (Communicable Disease Center, Chamble, Georgia [U. S. A.]).

Les agglutinations des Entérobactéries dans les sérums anti-*Candida* ont été recherchées au moyen des suspensions O par la méthode lente à l'étuve.

RÉSULTATS.

1° AGGLUTINATION DES *Candida* DANS LES SÉRUMS ANTI-*Salmonella* O. — Nous avons, dans un premier temps, utilisé l'agglutination sur lame dans des sérums polyvalents, puis en cas de réaction positive, dans les sérums monovalents correspondants. Les réactions positives ou douteuses ont été contrôlées par agglutination en tubes à partir de la dilution de 1/100. Les résultats positifs obtenus sont rapportés dans le tableau I.

TABLEAU I.

	Sérum anti <i>S. weycross</i> (O: 41)	Sérum anti <i>S. cholerae</i> suis (O: 6,7)
<i>C. albicans</i>	1.600	3.200
<i>C. guillermonti</i>	1.600	3.200
<i>C. tropicalis</i>	3.200	1.600

Nous n'avons pas trouvé d'agglutination de ces *Candida* dans les autres sérums anti-O des *Salmonella*.

C. parakrusei, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* et *C. krusei* n'ont été agglutinés par aucun sérum.

2° AGGLUTINATION DES SUSPENSIONS O DES *Salmonella* DANS LES SÉRUMS ANTI-*Candida*. — Des suspensions O de tous les groupes jusqu'à O : 51 ont servi à cette expérience.

Aucune suspension O de *Salmonella* n'a été agglutinée dans les sérums anti-*C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei* et *C. parakrusei*. Seuls les sérums anti-*C. albicans*, *C. guilliermondi* et *C. tropicalis* ont donné une réponse positive.

Nous avons ensuite saturé ces derniers sérums anti-*Candida* par les *Salmonella* qui y donnaient des agglutinations, et refait les titrages d'une part avec les souches homologues, d'autre part avec les suspensions O des *Salmonella* (tableau II).

TABLEAU II. — Titres agglutinants des sérums anti-*Candida* vis-à-vis des *Salmonella*.

Sérums	<i>Candida</i> homologue	<i>S.</i> <i>cholerae</i> suis (6,7)	<i>S.</i> <i>newport</i> (6,8)	<i>S.</i> <i>gallae</i> (6,11,44)	<i>S.</i> <i>wavecross</i> (41)	<i>S.</i> <i>tropicalis</i> (1,2)
Sérum <i>C. albicans</i> non saturé	800	100	-	-	-	200
" " saturé par <i>S. cholerae suis</i>	400	-	-	-	-	-
" " " <i>S. kentucky</i>	400	100	-	-	-	-
" <i>C. guilliermondi</i> non saturé	3.200	400	-	-	400	-
" " saturé par <i>S. chol. suis</i>	1.600	-	-	-	200	-
" " " <i>S. wavecross</i>	1.600	400	-	-	-	-
" <i>C. tropicalis</i> non saturé	3.200	400	400	400-800 ¹	200	400
" " saturé par <i>S. kentucky</i>	800	200	-	-	200	-
" " " <i>S. cholerae suis</i>	800	-	-	-	-	-
" " " <i>S. wavecross</i>	800	200	-	-	-	-
" " " <i>S. newport</i>	1.600	200	-	-	200	-
" " " <i>S. carrau</i>	800	200	-	-	200	-

TABLEAU III. — Titres agglutinants des sérums anti-*Candida* vis-à-vis des *Arizona* (O).

Arizona		Sérums anti- <i>Candida</i>						
Sérotype	Antigène O	anti- <i>tropicalis</i>	anti-pseudo- <i>tropicalis</i>	anti- <i>krusei</i>	anti- <i>parakrusei</i>	anti- <i>guilliermondi</i>	anti- <i>albicans</i>	anti- <i>stellatoidea</i>
7a,b:1,2,6	7a,b	-	200	-	-	-	-	-
7a,c:27,38	7a,c	-	-	-	100	-	-	-
13:13,14	13	400	-	-	-	800	-	200
17:29,25	17	-	-	-	-	400	-	100
27:23,25	27	400	-	-	-	400	400	200
Autres sérotypes d'Arizona		-	-	-	-	-	-	-

3° AGGLUTINATION DES SUSPENSIONS O D'Arizona DANS LES SÉRUMS ANTI-*Candida*. — Seuls 5 sérotypes sont agglutinés par les sérums anti-*Candida*. Aucune agglutination ne fut observée avec les 41 autres antigènes O (groupes et sous-groupes O jusqu'à O : 34) (tableau III).

DISCUSSION.

Trois espèces de *Candida* (*albicans*, *guillermonti*, *tropicalis*) sont agglutinées fortement par les sérums anti-O : 6,7 et O : 41 des *Salmonella*. Inversement le sérum anti-C. *albicans* n'agglutine qu'à un faible taux les suspensions 6,7 et 8,20. Ceci n'est vraisemblablement dû qu'à des facteurs mineurs des antigènes somatiques de *S. cholerae suis* et *S. kentucky*. Toute agglutination par ces *Salmonella* disparaît après saturation par *S. cholerae suis* (6,7) qui, dans le schéma de Kauffman-White, n'a pourtant pas d'antigène commun avec *S. kentucky* (8,20).

Le sérum anti-C. *guillermonti* agglutine uniquement les suspensions 6,7 et 41. Une partie au moins des facteurs antigéniques intervenant dans ces deux agglutinations sont différents car après saturation par 6,7 il reste des agglutinines pour O : 41 et inversement.

Le sérum anti-C. *tropicalis* agglutine les suspensions 6,7, 6,8, 6,14,24, 41 et 8,20. Si l'on suppose que ces agglutinations sont dues à trois facteurs différents, ces trois facteurs seraient contenus dans *S. cholerae suis* : la saturation par cette *Salmonella* fait disparaître toutes les agglutinines. *S. waycross* contiendrait deux facteurs : la saturation par cette *Salmonella* fait disparaître les agglutinations pour *S. newport*, *S. carrau* et *S. kentucky*. Mais elle ne posséderait pas le facteur de coagglutination propre à *S. cholerae suis* qui reste agglutinée par ce sérum saturé. Enfin, *S. kentucky*, *S. newport* et *S. carrau* ne porteraient qu'un seul facteur de coagglutination, le même pour les trois souches : en saturant par l'une d'elles, les agglutinines pour les deux autres disparaissent, tandis que subsistent les agglutinations de *S. cholerae suis* et *S. waycross*.

Certaines agglutinations des suspensions O d'Arizona pourraient s'expliquer en raison de leurs relations antigéniques avec les *Salmonella*. Ainsi l'antigène O : 13 Arizona a des rapports avec l'antigène O : 41 *Salmonella*, l'antigène 27 Arizona avec 6,7, 6,14,24, 41 *Salmonella*. D'autres sont inexplicables par les formules indiquées dans les schémas antigéniques : ainsi l'antigène 7 ac Arizona a des rapports étroits avec 6,14,24 *Salmonella*. Si les antigènes de coagglutination qui interviennent, étaient les mêmes que ceux qui servent au diagnostic sérologique habituel, la suspension 7 ac devrait être agglutinée comme *S. carrau* dans le sérum anti-

C. tropicalis ; le sérum *C. stellatoidea* qui agglutine *Arizona* O : 13 devrait lui aussi agglutiner la suspension de *Salmonella* O : 41 qui lui est antigéniquement très voisine ; de même l'antigène *Arizona* O : 17 est apparenté à l'antigène O : 11 *Salmonella*. Or, seule la suspension O : 17 *Arizona* est agglutinée par le sérum anti-*C. guillermonti*. Enfin, l'agglutination de la suspension *Arizona* O : 27 par le sérum anti-*C. stellatoidea* est inexplicable par sa parenté avec 6,7, 6,14,24 et 41 *Salmonella*, car ces suspensions ne sont pas agglutinées par ce sérum.

Il semble donc bien que les agglutinations des *Salmonella* et *Arizona* dans les sérums anti-*Candida* ne puissent être attribuées à l'un des antigènes des schémas diagnostiques, mais sont dues à des antigènes mineurs non mentionnés dans ces tableaux.

Il serait intéressant de rechercher si dans des infections spontanées à *Candida* on n'observe pas chez l'homme l'apparition d'agglutinines anti-*Salmonella* et anti-*Arizona* qui pourraient s'expliquer par les rapports antigéniques que nous avons mis en évidence dans les sérums de lapin immunisés.

RÉSUMÉ.

Candida albicans, *guillermonti* et *tropicalis* sont fortement agglutinés par les sérums anti-*Salmonella* O : 6,7 et O : 41. Inversement le sérum anti-*C. tropicalis* agglutine les suspensions de *Salmonella* 6,7, 6,8, 6,14,24, 8,20 et 41, le sérum anti-*C. guillermonti* les suspensions 6,7 et 41, le sérum *C. albicans* les suspensions 6,7 et 8,20. Ces trois sérums et le sérum anti-*C. stellatoidea* agglutinent aussi certaines suspensions O d'*Arizona*. *C. krusei* et *C. parakrusei* n'ont pas montré de rapports antigéniques avec les *Salmonella*. Les épreuves de saturations croisées montrent que ces agglutinations semblent dues pour la plupart à des antigènes mineurs ne figurant pas dans les schémas antigéniques utilisés pour le diagnostic sérologique des *Salmonella* et des *Arizona*.

SUMMARY

EXISTENCE OF ANTIGENS COMMON TO *Candida* AND *Salmonella*-*Arizona*.

Candida albicans, *guillermonti* and *tropicalis* are strongly agglutinated by anti-*Salmonella* 6,7 and 0,41 O-sera. Conversely, anti-*C. tropicalis* serum agglutinates suspensions of *Salmonella* 6,7, 6,8, 6,14,24,8, 20 and 41, anti-*C. guillermonti* serum agglutinates 6,7 and 41 suspensions, anti-*C. albicans* serum, 6,7 and 8,20 suspensions. These three sera and anti-*C. stellatoidea* serum also agglutinate certain *Arizona* O suspensions.

C. krusei and *C. parakrusei* did not show any antigenic relationship with *Salmonella*.

Saturation tests show that these agglutinations seem to be due for the most part to minor antigens which are not mentioned in the antigenic tables used for the serologic diagnosis of *Salmonella* and *Arizona*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KAMPELMACHER (E. H.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 1959, **25**, 289.
 - [2] KAUFFMANN (F.). *Acta path. microb. scand.*, 1944, **21**, 72.
 - [3] FLAMM (H.) et KUNZ (Ch.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1956, **166**, 424.
 - [4] AKSOYCAN (N.) et KAUFFMANN (F.). *Acta path. microb. scand.*, 1957, **40**, 345.
-

COMPOSITION ANTIGÉNIQUE DES TRÉPONÈMES

III. — L'ANTIGÈNE LIPIDIQUE DE WASSERMANN.

par M. FAURE et J. PILLOT (*)

(avec la collaboration technique de F. AUTIN et J. MARÉCHAL).

(*Institut Pasteur*)

Le tréponème Reiter, comme tous les organismes vivants, renferme de l'antigène lipidique de Wassermann. On a noté depuis longtemps [1, 2, 3] que l'extrait alcoolique de ce microorganisme possède des propriétés sérologiques analogues à celles des extraits lipidiques d'organes ; il fixe le complément et il floccule avec la réagine contenue dans le sérum des sujets syphilitiques et il permet d'éliminer cette réagine par épuisement du sérum. Mais, lorsque les divers auteurs ont cherché à mettre en évidence les propriétés immunologiques de cet antigène directement dans les corps tréponémiques, ils n'ont pas tous obtenu les mêmes résultats. Les uns sont parvenus à épuiser la réagine avec les tréponèmes [4, 5, 6, 7], les autres pas [8, 9, 10]. Pour les premiers, l'antigène de Wassermann intervient lorsqu'on effectue une réaction de fixation du complément avec des tréponèmes Reiter et un sérum syphilitique, pour les seconds cet antigène lipidique ne joue aucun rôle dans ce système. Enfin, si la majorité des chercheurs [9, 11, 12, 13, 14, 15] n'ont pas pu déceler la formation de réagine après injection du tréponème Reiter à l'homme et aux animaux, quelques expérimentateurs [16, 17, 18] disent avoir observé l'apparition de cet anticorps.

Alors que l'utilisation des tréponèmes Reiter s'avère pleine d'intérêt dans le sérodiagnostic de la syphilis, on voit que le problème de l'activité immunologique de l'antigène de Wassermann qu'ils contiennent n'est pas entièrement résolu.

Dans ce travail, nous avons cherché à préciser nos connaissances sur cet antigène lipidique et nous avons établi les faits suivants :

1° Le tréponème Reiter contient 20 p. 100 de lipides qui renferment une quantité importante de lécithine, et un phosphatide analogue chimiquement et sérologiquement au cardiolipide.

2° Dans le corps tréponémique, l'antigène de Wassermann se trouve sous une forme sérologiquement peu active. Cette activité

(*) Manuscrit reçu le 4 juillet 1960.

est plus importante dans les formes jeunes, spiralées et très mobiles du germe, que dans les formes âgées et vésiculées ; on la décèle plus facilement après le lavage des tréponèmes avec une solution dont le pH est de 7,2 et surtout après adjonction de lécithine et de cholestérol.

3° Dans les préparations antigéniques constituées par des tréponèmes broyés par les ultra sons, l'activité sérologique de l'antigène de Wassermann est si faible par rapport à celle de l'antigène protéique, que le rôle joué par l'antigène lipidique est pratiquement nul dans le diagnostic de la syphilis.

4° Nous n'avons jamais observé la formation de réagine chez les lapins et les cobayes après injection de tréponèmes Reiter.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. — LES LIPIDES DU TRÉPONÈME REITER ET L'ANTIGÈNE DE WASSERMANN.

1° *Etude chimique.*

a) *Extraction et dosage des lipides totaux.* — Pour extraire les lipides, on traite les tréponèmes lavés et encore humides, deux fois avec un excès d'éthanol bouillant, puis trois fois avec de l'éther bouillant. Lorsqu'on extrait ensuite le résidu microbien dans un appareil de Kumagawa avec de l'éthanol, puis du benzène, on ne retire plus qu'une quantité infime de produit. Ces extraits organiques renferment des lipides et des substances non lipidiques hydrosolubles, que l'on sépare par le procédé suivant : les solutions alcooliques et éthérées sont mélangées et évaporées à sec ; le résidu d'évaporation est dissous dans de l'éther que l'on agite avec un égal volume d'une solution aqueuse à 6 p. 100 de chlorure de sodium ; on brise l'émulsion formée par addition d'un volume d'acétone égal à celui de l'éther introduit ; il se sépare une phase éthérée et un précipité interfacial qui renferment les lipides, et une phase aqueuse qui contient les substances non lipidiques ; on élimine cette phase aqueuse et on lave deux fois la phase éthérée et le précipité interfacial avec la moitié de leur volume de la solution suivante : acétone, 1 vol. ; eau, 2 vol. ; CINa , 6 p. 100 ; on évapore à sec la solution éthérée et le précipité interfacial, on déshydrate le résidu d'évaporation que l'on reprend avec du chloroforme pour séparer les lipides d'avec le chlorure de sodium ; on pèse les lipides. La quantité de lipides obtenus est de 20 p. 100 du poids sec des tréponèmes avant l'extraction.

Pour préparer l'antigène protéique [19], nous avons délipidé le tréponème par des techniques susceptibles de ne pas altérer les

tidiques), 2 p. 1 000 ; lécithine, 15 p. 1 000. L'examen quantitatif de sérums de sujets syphilitiques et qualitatif de sérums de sujets non syphilitiques, a montré que la lécithine du tréponème possède des propriétés sérologiques identiques à celles de l'œuf, et que les acides phosphatidiques du tréponème présentent une activité très voisine de celle du cardiolipide, mais légèrement inférieure. La différence observée entre ces deux derniers produits est faible ; elle est pratiquement négligeable lorsqu'on exécute la réaction de Kline, elle n'est révélée que par la moindre sensibilité des résultats donnés par la réaction de Kolmer avec certains sérums ; nous pensons qu'elle est due à la purification imparfaite du phosphatide provenant du tréponème.

Les lipides extraits de la préparation protéique purifiée renferment 60 p. 100 environ de phosphatides (P : 2,20 p. 100). Ils sont sérologiquement actifs, et leur activité est augmentée par addition de lécithine et de cholestérol.

Les lipides du tréponème possèdent également une activité sérologique autre que celle d'antigène de Wassermann. Ils réagissent avec des sérums de lapin anti-Reiter dépourvus de réagine : fixation du complément et agglutination de microcristaux de cholestérol sensibilisés avec l'extrait lipidique. Des expériences en cours tendent à montrer que cette spécificité est due à un glucido-lipide que l'on retrouve également dans les préparations polyosidiques du tréponème Reiter.

II. — L'ACTIVITÉ SÉROLOGIQUE « IN VITRO » DE L'ANTIGÈNE DE WASSERMANN DANS LE CORPS TRÉPONÉMIQUE.

Pour révéler cette activité sérologique, on peut procéder de deux manières : soit chercher à éliminer la réagine contenue dans le sérum d'un sujet syphilitique en la fixant sur les tréponèmes ; soit tenter de fixer du complément avec ces tréponèmes en présence d'un sérum ne renfermant que de la réagine, les autres anticorps antitréponémiques ayant été éliminés.

1° *Etude de l'épuisement des sérums.*

Nous avons vérifié que l'épuisement de la réagine contenue dans un sérum syphilitique, à l'aide d'un antigène cardiolipidique, ne modifie pratiquement pas le titre de ce sérum lorsqu'on effectue une fixation du complément avec une suspension de tréponèmes, ni avec un antigène tréponémique traité par les ultrasons, ni avec une préparation de protéine tréponémique (tableau I). Par contre, l'épuisement de sérums syphilitiques, avec des tréponèmes entiers ou broyés par les ultra-sons, fait baisser le titre en réagine de ces sérums (fixation du complément, méthode de Kolmer et agglutination, méthode de Kline). Nous avons constaté constamment ce

phénomène et ceci dans des conditions expérimentales diverses. L'importance de l'épuisement est variable selon les préparations de tréponèmes utilisées. Nous avons abouti aux conclusions suivantes :

a) L'épuisement de la réagine avec une quantité déterminée de tréponèmes est pratiquement le même que les tréponèmes soient entiers ou broyés par les ultra-sons (tableau I).

b) L'épuisement d'un sérum syphilitique par cette même quan-

TABLEAU I. — Sérologie cardiolipidique et tréponémique d'un mélange de sérums syphilitiques épuisé par le cardiolipide ou par des tréponèmes, culture de 6 jours, lavés avec une solution pH 7,2. Influence de la délipidation et du traitement par les ultrasons sur les tréponèmes utilisés pour l'épuisement.

DILUTIONS DU SÉRUM	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Sérum initial :					
Kline	++++	++++	++++	+++	+
K. CL	++++	++++	++++	++++	++
K. trép.	++++	++++	++++	++	
Sérum épuisé par le cardiolipide :					
Kline	—	—	—	—	—
K. CL	—	—	—	—	—
K. trép.	+++—	++++	++++	+	
Sérum épuisé par les tréponèmes :					
Kline	++++	++++	++	—	—
K. CL	++++	++++	+++	—	—
K. trép.	—	—	—	—	—
Sérum épuisé par les tréponèmes délipidés :					
Kline	++++	++++	+++	+++	—
K. CL	++++	++++	+++	++++	+
K. trép.	—	—	—	—	—
Sérum épuisé par les tréponèmes ultrasonés :					
K. CL	++++	++++	++	—	—
K. trép.	—	—	—	—	—
Sérum épuisé par les tréponèmes ultrasonés et délipidés :					
K. CL	++++	++++	++++	++++	+
K. trép.	—	—	—	—	—

K. CL = Kolmer cardiolipidique, K. trép. = Kolmer antigène tréponémique.

tité de tréponèmes intègres ou traités par les ultra-sons, mais préalablement délipidés avec du butanol, puis de l'éther [49], ne modifie pas le titre de la réagine (tableau I).

c) Lorsqu'on épuise un sérum syphilitique avec des tréponèmes en quantité juste suffisante pour éliminer la totalité de l'anticorps antiprotéine de groupe, on enlève une partie de la réagine ; mais, on constate que la quantité de réagine éliminée est plus grande si l'on emploie des tréponèmes jeunes (forme spiralée mobile) provenant d'une culture de trois jours, que si on utilise des tréponèmes âgés (forme vésiculaire) provenant d'une culture datant de deux mois (tableau II).

d) L'épuisement de la réagine est environ deux fois plus important avec des tréponèmes préalablement lavés avec une solution tamponnée à pH 7,2, qu'avec ces mêmes tréponèmes non lavés (tableau II).

TABLEAU II. — Sérologie cardiolipidique et tréponémique d'un mélange de sérums syphilitiques épuisé par la quantité minimum de tréponèmes nécessaire à l'élimination de l'anticorps antiprotéine de groupe.

DILUTIONS DU SÉRUM —	1 —	1/2 —	1/4 —	1/8 —	1/16 —
Sérum initial :					
Kline	++++	++++	++++	+++	+
K. CL	++++	++++	++++	++++	++
K. trép.	++++	++++	++++	++	
Sérum épuisé par des tréponèmes lavés, culture de 3 jours :					
Kline	++++	++	+	—	—
K. CL (1)	++++	+++	++	—	—
K. trép.	—	—	—	—	—
Sérum épuisé par des tréponèmes lavés, culture de 2 mois :					
Kline	++++	++++	+++	++	—
K. CL (2)	++++	++++	++++	+	—
K. trép.	—	—	—	—	—
Sérum épuisé par des tréponèmes non la- vés, culture de 3 j. :					
Kline	++++	++++	++++	+++	—
K. CL (3)	++++	++++	++++	++++	+
K. trép.	—	—	—	—	—

1 et 2 : influence de l'âge de la culture des tréponèmes utilisés pour l'épuisement ; les tréponèmes ont été lavés avec une solution à pH 7,2. — 1 et 3 : influence du lavage des tréponèmes, culture de 3 jours.

K. CL = Kolmer cardiolipide, K. trép. = Kolmer antigène tréponémique.

2° Etude de la fixation du complément avec la réagine syphilitique.

On utilise des sérums ne contenant que de la réagine ; on les obtient en épuisant des sérums de sujets syphilitiques avec des tréponèmes délipidés. De tels sérums ne fixent pratiquement pas le complément en présence d'une suspension de tréponème lorsqu'on utilise cet antigène à la dilution optimum pour le système protéine de groupe-antiprotéine ; si on emploie cette suspension à une concentration supérieure à cet optimum (deux à quatre fois), on obtient une légère fixation du complément.

a) Après traitement des tréponèmes par les ultra-sons, la réactivité vis-à-vis de la réagine est légèrement diminuée ; par contre, le titre de l'antigène protéique de groupe est doublé ou quadruplé. Pour mettre en évidence l'activité antigène de Wassermann dans une préparation ultrasonnée, il faut donc l'introduire à une concentration quatre à huit fois plus élevée que la concentration optima pour l'antigène protéique.

b) Avec l'extrait protéique purifié, on observe un phénomène analogue ; mais ici, pour déceler la présence de l'antigène de Wassermann, on doit employer une solution dix fois au moins plus concentrée que celle utilisée pour titrer l'anti-protéine.

Lorsqu'on exécute des réactions de fixation du complément avec des préparations antigéniques concentrées, il est important d'examiner très soigneusement les témoins antigènes et de ne tenir compte que des résultats franchement positifs en présence des antigènes dénués de pouvoir anticomplémentaire.

Les fixations du complément observées avec le sérum de sujet syphilitique épuisé avec des tréponèmes délipidés et les préparations concentrées de tréponèmes entiers, de tréponèmes lysés par les ultra-sons et d'extrait protéique purifié, sont bien dues au système antigène de Wassermann-réagine, car elles disparaissent si on épuise à nouveau le sérum avec de l'antigène de Kline. La sensibilité des réactions obtenues avec la réagine est toujours faible avec ces trois types de préparation antigéniques ; elle est relativement plus importante avec les tréponèmes entiers qu'avec les tréponèmes ultrasonnés et nettement moindre avec l'extrait protéique, mais dans tous les cas, elle est inférieure à la sensibilité de la réaction donnée par un antigène à base de cardiolipide-lécithine-cholestérol.

L'activité sérologique du cardiolipide est considérablement augmentée par addition de lécithine et de cholestérol ; on observe un phénomène d'activation analogue avec l'antigène de Wassermann contenu dans le tréponème. Lorsqu'on additionne les tréponèmes entiers ou lysés par les ultra-sons de lécithine et de cholestérol, on augmente leur activité vis-à-vis de la réagine. Cette activation se

traduit par une augmentation du titre de l'antigène et surtout de la sensibilité de la réaction. Elle dépend des proportions relatives des substances introduites, l'effet optimum étant obtenu avec le mélange suivant : tréponème 2,5 mg, lécithine 0,125 mg, cholestérol 1 mg ; dans ce cas, le titre de l'antigène dans le système antigène de Wassermann-réagine peut devenir égal à celui de cette même préparation utilisée dans le système protéine de groupe-antiprotéine. L'importance de ce phénomène d'activation est variable selon les lots d'antigène examinés et avec les extraits protéiques purifiés nous n'avons jamais obtenu que des activations très faibles ; mais, dans tous les cas, le mélange lécithine-cholestérol n'exerce son action activante que sur l'antigène de Wassermann, il est totalement sans effet sur l'antigène protéique de groupe.

Lorsqu'on cherche à épuiser la réagine contenue dans un sérum avec des tréponèmes, on observe également une augmentation de cet épuisement lorsqu'on additionne les tréponèmes de lécithine et de cholestérol : l'élimination de la réagine est quatre à huit fois plus importante en présence de la dose optimum du mélange lécithine-cholestérol qu'en son absence.

3° Le séro-diagnostic de la syphilis à l'aide des antigènes tréponémiques. Rôle joué par l'antigène de Wassermann.

C'est pour mettre en évidence un anticorps différent de la réagine qu'il est intéressant de faire appel à un antigène tréponémique lorsqu'on désire confirmer un diagnostic de syphilis. Il est donc important que, dans la préparation utilisée, l'antigène de Wassermann ait été éliminé ou qu'il n'intervienne pas dans la réaction sérologique.

Les diverses préparations obtenues à partir du tréponème de Reiter renferment toutes de l'antigène de Wassermann, même l'extrait protéique purifié, et jusqu'à présent nous ne sommes pas parvenus à délipider totalement les protéines tréponémiques sans altérer leur propriété antigénique.

Nous avons vu que dans ces préparations l'antigène de Wassermann est sous une forme sérologiquement peu active et que son titre antigénique est inférieur à celui de l'antigène protéique. On cherchera donc à obtenir des produits dans lesquels l'écart entre ces deux titres sera aussi grand que possible afin de pouvoir se placer dans des conditions telles que seul l'antigène protéique puisse intervenir dans la réaction. Pour avoir le minimum d'activité Wassermann et le maximum d'activité protéique, on écartera les formes jeunes des tréponèmes et on utilisera des formes âgées lysées par les ultra-sons. Dans ces conditions, on obtiendra des préparations dans lesquelles la sensibilité de l'antigène de Wasser-

mann est très faible et le rapport des titres antigène protéique/antigène de Wassermann est égal au moins à 8. L'extrait protéique purifié présente des caractéristiques sérologiques analogues aux précédentes : la sensibilité de l'antigène de Wassermann est encore moindre et le rapport des titres antigéniques supérieur à 8. Avec ces deux types de préparation, on peut déceler spécifiquement l'anticorps antiprotéine de groupe même en présence de réagine.

Dans un article antérieur [23] nous avons rapporté les résultats obtenus lors de l'examen de 8 000 sérums avec ces deux préparations antigéniques que nous avons dénommées « antigène tréponémique » et « extrait protéique ». Leur spécificité s'est montrée excellente et pratiquement identique. Les réactions discordantes ont été peu nombreuses ; on ne peut pas les attribuer à la présence d'une quantité d'antigène de Wassermann plus importante dans l'une des préparations que dans l'autre car la dissociation s'est produite tantôt en faveur d'une plus grande réactivité de l'« antigène tréponémique », tantôt en faveur de l'« extrait protéique ».

L'examen de sérum donnant des réactions « faussement positives » avec des antigènes cardiolipidiques, a montré que dans ces cas très rares les préparations tréponémiques donnent des résultats plus spécifiques de la syphilis que le cardiolipide [24], ceci tend à exclure l'intervention de l'antigène de Wassermann dans ces antigènes tréponémiques.

III. — L'ÉLABORATION DE LA RÉAGINE.

Afin de rechercher si le tréponème Reiter est susceptible de provoquer la formation de réagine, nous avons immunisé plusieurs lots de lapins et des cobayes dans des conditions variées. Le sérum des animaux a été examiné à l'aide de la réaction de Kline, de la réaction de Kolmer avec un antigène cardiolipidique et de la réaction de Kolmer avec un antigène tréponémique ; ces examens ont été faits avant, pendant et après l'immunisation.

L'immunisation des lapins a été faite par voie intraveineuse avec des tréponèmes récoltés par centrifugation. Les diverses modalités ont porté sur les points suivants :

1° La durée de l'immunisation : de quatre semaines, avec un total de 10 injections, à trois mois avec un total de 22 injections.

2° La concentration de l'antigène injecté : de 0,5 à 3 mg de substances sèches par centimètre cube.

3° Les conditions de culture du tréponème : milieu VF additionné d'acide thioglycolique, ou milieu du type Brewer, auxquels on adjoint 10 p. 100 de sérum de cheval ou de lapin.

4° Le mode de préparation de l'antigène : tréponèmes fraîchement récoltés avant chaque injection et non lavés, ou tréponèmes lavés trois fois avec de l'eau physiologique et conservés à -15° pendant la durée de l'immunisation.

5° Le stade morphologique des tréponèmes injectés : formes jeunes spirales mobiles (culture de 3 à 4 jours) ou formes âgées vésiculaires (culture de 2 mois).

Dans tous les cas, nous avons obtenu des sérums riches en anticorps antitréponème Reiter : titre des sérums examinés à l'aide de la réaction de Kolmer avec l'antigène tréponémique 1/200-1/400. Par contre, nous n'avons jamais constaté, quels que soient la modalité et le moment de l'immunisation, l'apparition, même transitoire, d'une quantité notable de réagine. Des résultats analogues ont été obtenus par Pautrizel (communication orale) avec des tréponèmes broyés par les ultra-sons.

Les cobayes ont été immunisés par voie intrapéritonéale. Ils ont donné, comme les lapins, des anticorps antitréponème Reiter, mais à un taux moindre et ils n'ont pas élaboré de réagine.

Lorsqu'on examine le sérum des lapins avant leur immunisation, on observe très fréquemment des réactions sérologiques positives. Ces réactions sont généralement peu intenses ; il est rare que la technique de Kolmer réalisée avec un antigène cardiolipidique et que la méthode de Kline donnent des résultats positifs lorsque les sérums sont dilués au-delà de 1/4. L'intensité de ces réactions est sujette à des variations spontanées que l'on observe chez les lapins témoins qui ne reçoivent pas d'injection et chez des lapins auxquels on administre des antigènes sans rapport avec le tréponème Reiter (ovalbumine, anatoxine diphtérique,). Les auteurs qui ont cru pouvoir affirmer la formation de réagine chez le lapin après injection de tréponème Reiter ont en fait obtenu des réactions peu intenses que l'on peut interpréter comme des fluctuations sérologiques spontanées.

DISCUSSION.

Nous avons trouvé dans le tréponème Reiter une teneur en lipides de 20 p. 100. Ce chiffre est inférieur à ceux donnés par d'autres auteurs, d'Alessandro en particulier qui indique une valeur de 33 p. 100 [25]. Ces lipides sont riches en phosphatides (60 p. 100), ce qui favorise l'entraînement d'une quantité importante de substances non lipidiques dans les solvants organiques d'extraction. Dans la méthode de dosage que nous avons utilisée, les substances non lipidiques ont été éliminées ; ceci explique pourquoi le poids de lipides que nous avons obtenu est inférieur à ceux des auteurs qui n'ont pas effectué cette purification.

Nous avons observé que l'activité sérologique *in vitro* de l'antigène de Wassermann contenu dans le tréponème dépend beaucoup de l'état dans lequel se trouve ce microorganisme, en particulier, de son âge et du fait qu'il a subi ou non des lavages. Ces observations permettent de comprendre comment les divers expérimentateurs ont pu obtenir des résultats différents les uns des autres lorsqu'ils n'ont pas tenu compte de ces facteurs et comment un même auteur, Eagle [4, 9], a publié successivement des résultats contradictoires. Puccinelli [10] met en doute l'existence de cet antigène lipidique au sein de certaines souches de tréponèmes Reiter ; nous ne pensons pas que ce fait puisse être exact car l'antigène de Wassermann semble être universellement répandu dans la nature.

Lorsqu'on lave les tréponèmes avec une solution dont le pH est de 7,2, on élimine des substances sérologiquement inertes et l'activité Wassermann est très notablement augmentée ; par contre, après broyage de ces tréponèmes par les ultrasons, cette activité est faiblement diminuée. Ces faits laissent présager que cet antigène lipidique n'est pas présent à la surface même du tréponème et qu'il occupe une position périphérique mais non centrale dans le corps microbien.

L'extrait protéique purifié que nous avons préparé renferme encore 4 % de lipides sérologiquement actifs. On peut penser que l'A. T. P. S. des auteurs italiens présente une composition analogue. En effet, en étudiant la réaction A. T. P. S.-sérum syphilitique à l'aide de la fixation du complément, de Bruijn [26] a observé avec les concentrations élevées d'antigène, l'existence d'un système immunologique différent du couple protéine-antiprotéine ; cet auteur identifie ce système à la combinaison antigène de Wassermann-réagine, car cette réaction disparaît après élimination de la réagine contenue dans le sérum.

Lorsqu'on désire utiliser un antigène tréponémique pour établir un séro-diagnostic de la syphilis, l'emploi de protéine purifiée ne permet pas d'exclure d'une manière absolue la possibilité d'une réaction avec l'antigène de Wassermann puisque cette préparation en renferme. Cependant, dans la pratique sérologique, le rôle éventuel de cet antigène lipidique pourra être réduit à un degré négligeable si on prend la précaution de préparer un produit dans lequel le rapport des titres antigène protéique de groupe-antigène de Wassermann est très élevé.

Actuellement, presque tous les sérologistes admettent que la réagine est un anticorps, mais les opinions divergent lorsqu'on cherche à expliquer son origine. Pour certains, ce serait un auto-anticorps puisque l'hôte parasité possède lui-même cet antigène. Pour d'autres, c'est un anticorps anti-tréponème propre au tréponème pathogène puisque *Treponema pallidum*, même tué, est sus-

ceptible de provoquer sa formation [27, 28, 29]; c'est cette deuxième conception qui tend à prévaloir actuellement. Il était donc intéressant de vérifier qu'un germe voisin du tréponème pâle, mais non pathogène, le tréponème Reiter, ne provoque pas la formation de réagine; c'est ce que nous avons constaté chez le lapin et le cobaye.

Cependant le problème est complexe et l'on se trouve devant des faits paradoxaux. L'antigène de Wassermann que l'on trouve chez les animaux, les plantes et les microorganismes n'engendre habituellement pas de réagine; il se présente sous la forme d'haptène; mais, cet haptène, quelle que soit son origine, peut être converti en antigène lorsque, après l'avoir extrait avec des solvants organiques on le combine à certaines protéines étrangères à l'animal qui doit le recevoir: extrait alcoolique d'organe + sérum de porc ou d'homme, flocculats spécifiques de suspension lipidique (Kahn, Meinike, V. D. R. L.)-réagine humaine, administrés à des lapins (1). Les lipides du tréponème Reiter sont antigéniques comme les extraits lipidiques d'organes lorsqu'on les administre dans les conditions analogues aux précédentes [30]; il n'est pas nécessaire de faire appel à leur origine tréponémique pour expliquer leur antigénicité. L'haptène de Wassermann qui est inclus dans le corps du tréponème Reiter se comporte comme celui qui est présent chez les animaux, les végétaux et les autres microorganismes: il est incapable dans cet état de provoquer directement la formation de réagine.

RÉSUMÉ.

Le tréponème Reiter renferme 20 p. 100 de lipides qui contiennent une quantité importante de lécithine et un phosphatide analogue au cardiolipide.

Dans le corps tréponémique, l'antigène de Wassermann se trouve sous une forme sérologiquement peu active *in vitro*. Cette activité est plus marquée dans les formes jeunes spiralées du germe que dans les formes âgées et vésiculées; elle devient plus importante après lavage des tréponèmes et surtout après l'adjonction de lécithine et de cholestérol.

L'antigène de Wassermann contenu dans le tréponème Reiter n'intervient pratiquement pas dans le séro-diagnostic de la syphilis

(1) Nous avons reproduit ces diverses expériences et nous avons vérifié que les flocculats spécifiques Meinicke-réagine de lapin ne sont pas antigéniques chez le lapin. Notons également que nous ne sommes pas parvenus à provoquer la formation de réagine en injectant le mélange d'extrait alcoolique de cœur et de sérum de porc à des cobayes par voies intrapéritonéale et intramusculaire, et à un cheval et à un bouc par voies intraveineuse et intramusculaire.

si l'on utilise des préparations dans lesquelles le titre de l'antigène protéique de groupe est très supérieur au titre de l'antigène lipidique.

Nous n'avons jamais observé la formation de réagine chez les lapins et les cobayes après injection de tréponèmes Reiter.

SUMMARY

ANTIGENIC CONSTITUTION OF TREPONEMA. III. THE WASSERMANN'S LIPIDIC ANTIGEN.

Reiter's *Treponema* contains 20 p. 100 lipids, which are constituted of an important amount of lecithin and a phosphatid resembling cardiolipid.

In the *Treponema* the Wasserman antigen is present under an *in vitro* not very active serological form. This activity is more marked in the young spiral forms of the microorganism than in the old vesiculated ones ; it increases after washing of the *Treponemas*, and particularly after addition of lecithin and cholesterol.

Wassermann's antigen plays no part in the serodiagnostics of syphilis if preparations are used in which the titer of the group antigen is at a much higher level than the titer of the lipidic antigen.

The authors never observed any reagin formation in rabbits and guinea pigs after injection of Reiter's *Treponema*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KLOPSTOCK (F.). *Dtsche med. Wschr.*, 1927, **53**, 1261.
- [2] HOELTZER (R. R.) et POPOFF (W. J.). *Z. Immun. Forsch.*, 1928, **59**, 501.
- [3] BECK (A.). *J. Hyg.*, 1939, **39**, 298.
- [4] EAGLE (H.) et HOGAN (R. B.). *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 215.
- [5] ALESSANDRO (G. D'), BLASI (R. DE). *Boll. Soc. Ital. Biol. sper.*, 1941, **16**, 469.
- [6] ALESSANDRO (G. D'). *Boll. Ist. sieroter milan.*, 1946, **25**, 138.
- [7] JENEY (E.), CSOKA (I.) et BIRA (L.). *Z. Immun. Forsch.*, 1957, **113**, 489.
- [8] GAETHGENS (W.). *Z. Immun. Forsch.*, 1929, **63**, 398.
- [9] EAGLE (H.) et GERMUTH (F. G.). *J. Immunol.*, 1948, **60**, 223.
- [10] PUCCINELLI (V. A.). *Amer. J. Syph.*, 1951, **35**, 340.
- [11] PUCCINELLI (V. A.) et BELLONE (A. G.). *Giorn. Ital. Dermat. Sif.*, 1949, **90**, 362.
- [12] GAETHGENS (W.). *Z. Immun. Forsch.*, 1932, **73**, 527.
- [13] GRUNEBERG (T.). *Dermat. Wschr.*, 1934, **99**, 1330.
- [14] PLAUT (F.). *Z. Immun. Forsch.*, 1934, **81**, 479.
- [15] GELPERIN (A.). *Amer. J. Syph.*, 1951, **35**, 1.
- [16] HIPPIUS (H.). *Z. Immun. Forsch.*, 1954, **111**, 491.

- [17] FROMM (G.). *Z. Hyg.*, 1955, **141**, 469.
 - [18] GASTINEL (P.), VAISMAN (A.) et HAMELIN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 249.
 - [19] PILLOT (J.) et FAURE (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 196.
 - [20] FAURE (M.) et MORELEC-COULON (M. J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 180.
 - [21] FAURE (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1950, **32**, 1950.
 - [22] COULON-MORELEC (M. J.) et FAURE (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1960 (sous presse).
 - [23] PILLOT (J.), DUPOUEY (P.) et FAURE (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 734.
 - [24] DAGUET (G. L.), PILLOT (J.) et FAURE (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 463.
 - [25] ALESSANDRO (G. D'), ODDO (F.), COMES (R.) et DARDANONI (L.). *Riv. Ist. sieroterap. ital.*, 1949, **24**, 134.
 - [26] DE BRUIJN (J. H.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 1958, **24**, 253.
 - [27] EAGLE (H.) et FLEISHMAN (R.). *J. exp. Med.*, 1948, **87**, 369.
 - [28] MAC LEOD (C.) et MAGNUSON (H.). *Amer. J. Syph.*, 1953, **37**, 9.
 - [29] DARDANONI (L.). *Riv. Ist. sieroterap. ital.*, 1955, **30**, 105.
 - [30] FUHNER (F.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1957, **170**, 74.
-

SUR LA RÉACTIVATION D'ESCHERICHIA COLI APRÈS TRAITEMENT PAR LES RAYONS ULTRA-VIOLETS

I. RÉACTIVATION EN BOUILLON ET A L'OBSCURITÉ

par R. LINZ et E. LECOCQ (*).

*(Laboratoire de Bactériologie de l'Université Libre de Bruxelles
et Laboratoire de Biologie Clinique
de l'Hôpital Universitaire St-Pierre, Bruxelles.)*

Une forte proportion des bactéries apparemment tuées par les rayons ultra-violets peuvent redevenir rapidement capables de former des colonies. Elles ne sont pas tuées, mais inactivées, et peuvent se « réactiver » [3, 8]. Kelner a montré que cette réactivation était favorisée par la lumière visible (« photoréactivation »). Le mécanisme de l'inactivation par les ultra-violets et de la réactivation ultérieure n'a pas été élucidé. Les expériences suivantes constituent une contribution à la solution de ce problème.

TECHNIQUES ET DÉFINITIONS

Les techniques ont été décrites ailleurs [4, 5, 6].

Rappelons que deux souches d'*E. coli* ont servi : la souche B et la souche K12. En général, les résultats expérimentaux sont semblables ; les exceptions seront signalées. Dans certaines expériences, nous avons employé des variants de ces souches résistants à la tétracycline (50 µg par ml), variants désignés par les initiales rT et obtenus par la méthode des gradients de Szybalski et Bryson [9].

Les souches sensibles sont cultivées sur gélose inclinée ; les variants rT, sur gélose additionnée de 5 µg de chlorhydrate de tétracycline par millilitre. Cependant, au moment de l'emploi, même les résistants sont ensemencés sur des tubes de gélose inclinée sans antibiotique, afin que les suspensions microbiennes n'en contiennent pas. Après vingt heures d'étuve à 37°, les cultures sont émulsionnées dans de la solution physiologique stérile (NaCl à 0,9 p. 100) sans entraîner de gélose. Les bacilles sensibles sont mis en suspension dans 10 ml de liquide par tube de gélose, les variants résistants dans un volume tel que le trouble soit semblable au précédent.

En général, les bactéries ne sont pas lavées.

(*) Manuscrit reçu le 31 mai 1960.

Pour les numérations, les suspensions microbiennes sont diluées en eau salée (NaCl 0,9 p. 100) et des portions de 0,5 ml incorporées à la gélose nutritive dans les flacons Astell. On porte à l'étuve à 37° et les colonies sont comptées avec l'aide d'une loupe lorsqu'elles se sont bien développées (deux jours habituellement, quatre à cinq jours si le milieu a été additionné de streptomycine et de tétracycline).

Pour chaque dilution microbienne, 5 flacons, parfois 3, sont préparés. On calcule la moyenne et le coefficient de variation, $V = (100 \times \sigma) / \overline{m}$. Dans les tableaux, ce coefficient figure entre parenthèses au-dessous des valeurs moyennes.

DÉFINITIONS. — Les bactéries capables de former des colonies sont certainement vivantes, mais celles qui n'en sont pas capables ne sont pas nécessairement mortes : la réactivation des bactéries traitées par les ultra-violets en est une preuve. Nous appellerons *bactéries viables* celles qui sont capables de former des colonies.

Nous désignerons sous le nom de *bactéries irradiées* celles qui ont été traitées par les ultra-violets. Aucune confusion n'est possible, puisqu'aucune autre irradiation nocive n'est utilisée.

La suspension de bactéries témoin, non irradiée, est diluée en eau salée, de sorte que la concentration de bactéries viables soit proche de celle de la suspension irradiée, aussitôt après l'irradiation, avant toute réactivation. Cette dilution est généralement 10^{-6} ou 10^{-7} . Elle sera appelée *suspension témoin diluée*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

EXPÉRIENCE 1. — Une suspension d'*E. coli* B est divisée en deux portions de 15 ml. L'une est traitée trois minutes par les ultra-violets ; l'autre, témoin, n'est pas irradiée, mais est diluée au dix-millionième.

Une partie des deux suspensions sert à des numérations des bactéries viables. Le reste est mélangé avec un volume égal de bouillon nutritif chauffé à 37°. On mélange bien, on réserve 3 ml (temps zéro) et on porte au bain-marie à 37°. Les tubes plongent dans celui-ci par les trous d'un couvercle métallique ; l'incubation se fait donc à l'obscurité. Après quinze et trente minutes, une, deux, quatre, six, huit, vingt-deux et quarante-six heures, on prélève un peu de la culture pour dénombrer les cellules capables de former des colonies. On calcule chaque fois le rapport entre le nombre trouvé et le nombre trouvé au temps zéro (facteur F).

La suspension irradiée contient, par millilitre, 2 055 cellules viables ($V = 4,1$) ; avant irradiation, elle en contenait $5\,390 \times 10^7$ par millilitre ($V = 3,2$) ; les ultra-violets ont donc abaissé ce chiffre environ 4×10^6 fois.

L'évolution des cultures en bouillon et à l'obscurité (tableau I) appelle les commentaires suivants :

a) La suspension irradiée, diluée de moitié en bouillon, devrait

donner, au temps zéro, 1 027 colonies par millilitre. Or, elle en fournit 2 360. Cette multiplication apparente instantanée n'existe pas dans le cas du témoin (calculé 2 695, trouvé 2 620). Il s'agit d'une réactivation, la multiplication étant inimaginable. Cette réactivation n'est pas toujours instantanée : on verra plus loin des exemples où elle se manifeste après quinze ou trente minutes.

TABLEAU I. — Multiplication en bouillon à 37° et dans l'obscurité d'E. coli B non traité ou traité (trois minutes) par les U. V.

Temps d'incub. à 37°.	Culture "témoin"		Culture "U.V."	
	Nombre de colonies par ml.	F	Nombre de colonies par ml.	F
0 min.	2.620 (2,3)	1	2.360 (6,3)	1,00
15 min.	2.730 (2,4)	1	4.100 (3,4)	1,7
30 min.	2.800 (0,9)	1	9.605 (2,4)	4
1 h.	4.510 (6,2)	1,7	15.525 (4,3)	7
2 h.	39.620 (6,6)	15	333 x 10 ³ (4,0)	145
4 h.	3.501 x 10 ³ (1,4)	13 x 10 ²	901 x 10 ³ (8,9)	4 x 10 ²
6 h.	593 x 10 ⁵ (5,0)	23 x 10 ³	1.270 x 10 ⁴ (1,9)	55 x 10 ²
8 h.	935 x 10 ⁶ (4,1)	35 x 10 ⁴	5.908 x 10 ⁴ (5,1)	25 x 10 ³
22 h.	1.058 x 10 ⁶ (0,6)	40 x 10 ⁴	1.391 x 10 ⁵ (4,3)	59 x 10 ³
46 h.	648 x 10 ⁶ (3,7)	24 x 10 ⁴	1.492 x 10 ⁵ (6,2)	63 x 10 ²

Dans ce tableau et les suivants, entre parenthèses, à la seconde ligne de chaque case, les coefficients de variation.

b) La réactivation se poursuit pendant les trente premières minutes d'incubation : le facteur F est égal à 4, et il est impossible que les bactéries irradiées se multiplient effectivement à un moment où les bacilles témoins ne se divisent pas encore (F = 1,1).

c) Dans la période qui s'étend de trente minutes à deux heures, les témoins se divisent, mais la division apparente des bacilles irradiés est beaucoup plus rapide : il s'agit encore, soit de réactivation, soit de réactivation superposée à une multiplication véritable.

d) A partir de la quatrième heure, les bactéries témoins se divisent très rapidement ; au contraire, les cellules irradiées se

divisent plus lentement. Les bactéries témoins rattrapent l'avance des bactéries irradiées et deviennent plus nombreuses qu'elles.

e) La culture témoin s'appauvrit entre la vingt-deuxième et la quarante-sixième heure (mortalité normale) ; la culture des bacilles irradiés ne s'appauvrit pas.

EXPÉRIENCE 2. — Quelle est l'influence de la durée de l'irradiation par les ultra-violets sur la multiplication des colibacilles en bouillon ?

Une suspension d'*E. coli* B est divisée en cinq portions qui sont soumises aux rayons ultra-violets pendant zéro, une, trois, neuf et vingt-sept minutes respectivement. On dilue la portion non irradiée à 10^{-5} (suspension diluée témoin). Chacune est mélangée avec du bouillon à 37° et placée dans le bain-marie à 37°. L'évolution des cinq cultures figure au tableau II.

TABLEAU II. — Multiplication, en bouillon et dans l'obscurité, d'*E. coli* B traité par les U. V. pendant des temps variables.

Durée d'incubation des cultures	Temps d'irradiation par U.V. avant culture.									
	0 min. (tém.)	1 minute	3 minutes	9 minutes	27 minutes					
	Col.	F	Col.	F	Col.	F	Col.	F	Col.	F
0	10850 (6,2)	1	686×10^4 (4,2)	1	5055 (3,4)	1	1.248 (3,5)	1	838 (6,4)	1
30 min.	12200 (1,3)	1	960×10^4 (4,0)	1,5	15175 (4,6)	3	2.129 (5,1)	1,7	1260 (3,5)	1,5
60 min.	15650 (2,4)	1,5	176×10^5 (5,1)	2,5	21050 (4,8)	4	2.622 (0,9)	2	1682 (2,8)	2
24 h.	263×10^7 (6,7)	24×10^4	492×10^6 (4,9)	71	223×10^7 (5,5)	44×10^4	196×10^5 (3,9)	15×10^3	996×10^4 (3,4)	12×10^3
50 h.	618×10^6 (1,3)	6×10^4	142×10^6 (6,3)	21	243×10^7 (2,1)	48×10^4	260×10^6 (6,7)	21×10^4	131×10^6 (6,6)	15×10^6

Col. = nombre de colonies par millilitre.

Avant le mélange avec le bouillon, la suspension diluée témoin contenait 21 625 cellules viables par centimètre cube ($V = 6,6$), la suspension irradiée pendant une minute $1\,156 \times 10^4$ ($V = 4,7$), la suspension irradiée trois minutes 13 425 ($V = 8,6$), la suspension irradiée neuf minutes 2 030 ($V = 2,3$), la suspension irradiée vingt-sept minutes 1 314 ($V = 2,8$). Il subsiste donc, dans la suspension irradiée une minute, 5×10^{-3} des cellules viables, dans la suspension irradiée trois minutes, 6×10^{-6} , dans la suspension irradiée neuf minutes, 9×10^{-7} , dans la suspension irradiée vingt-sept minutes, 6×10^{-7} .

La dilution dans le bouillon réduit encore ces chiffres de moitié environ, comme le veut le calcul ; il n'y a pas ici de réactivation

immédiate. Mais, dans les trente ou soixante premières minutes de l'incubation à 37°, la multiplication apparente des cultures des bacilles irradiés dépasse nettement celle des bacilles témoins ; elle représente la réactivation de cellules lésées plutôt qu'une multiplication réelle. Elle est plus marquée lorsque les bacilles ont été irradiés pendant trois minutes que lorsqu'ils l'ont été pendant un temps plus long ou plus court.

Comme précédemment, après vingt-quatre heures d'incubation, les cultures de bacilles irradiés sont moins riches en cellules viables que la culture témoin. Elles sont d'autant moins riches que l'irradiation a été plus longue. Elles ne varient pratiquement plus jusqu'à la cinquantième heure, sauf la culture des bacilles irradiés pendant une minute ; celle-ci s'appauvrit, tout comme la culture témoin.

EXPÉRIENCE 3. — Pourquoi les cultures des bacilles irradiés pendant trois ou neuf minutes sont-elles moins riches, après un jour d'incubation à 37°, que les cultures des bacilles non irradiés ? Les bacilles irradiés sont-ils devenus incapables de se diviser autant de fois que les bacilles normaux ?

La différence avec ceux-ci se manifeste après de nombreuses divisions cellulaires ; est-elle provoquée par un caractère transmis à la descendance des bacilles irradiés ? Examinons donc cette descendance.

Des cultures de l'expérience n° 2 âgées de vingt-quatre heures, on prélève une goutte et on l'ensemence dans 5 ml de bouillon neuf. Les cultures-filles sont portées au bain-marie à 37° ; après vingt-six heures, elles contiennent, par millilitre :

a) Culture-fille des bacilles témoins : 698×10^6 ($V = 2,8$).

b) Culture-fille des bacilles irradiés trois minutes : 754×10^6 ($V = 3,7$).

c) Culture-fille des bacilles irradiés neuf minutes : 725×10^6 ($V = 3,1$).

La richesse de toutes les cultures-filles est donc la même. La descendance des bacilles irradiés conserve un pouvoir de multiplication normal.

EXPÉRIENCE 4. — Pourquoi seules les primo-cultures des bacilles irradiés sont-elles moins riches ? Contiennent-elles un facteur inhibiteur apporté par la suspension irradiée elle-même ? Cette dernière peut-elle inhiber la multiplication des colibacilles non irradiés ?

Une suspension d'*E. coli* B est divisée en deux parties ; l'une, témoin, est conservée intacte, l'autre est soumise pendant trois

minutes aux ultra-violets. La suspension témoin est diluée au millionnième et au deux cent millième. Dans des tubes de 3 ml de bouillon chauffé à 37°, on introduit :

Tube A : 3 ml de la suspension témoin diluée 10^{-6} .

Tube B : 3 ml de la suspension irradiée.

Tube C : 3 ml de la suspension irradiée + 0,3 ml suspension témoin diluée $1/2 \times 10^{-5}$.

Le tube C reçoit ainsi, sans dilution notable de son contenu, le même nombre de bacilles témoins que le tube A. Les trois tubes sont portés au bain-marie à 37°. Des numérations des cellules viables sont faites aussitôt et après vingt-quatre et quarante-huit heures à 37° (tableau III). Pour chaque culture de vingt-quatre et quarante-huit heures, on calcule le quotient :

$$Q = \frac{\text{richesse de la culture}}{\text{richesse de la culture témoin (A) au même moment.}}$$

TABLEAU III. — Action d'E. coli B irradié trois minutes par les ultra-violets sur la multiplication en bouillon des bacilles non irradiés.

	Temps d'incubation à 37°					
	0		24 heures.		48 heures.	
	Nb.col. (x 1)		Nb.col. (x 10^5)	Q	Nb.col. (x 10^5)	Q
A. Susp. témoin.	1.007 (3,1)		10.633 (5,5)	1	7.225 (4,0)	1
B. Susp. irradiée.	4.187 (0,5)		3.130 (2,2)	0,3	8.750 (5,4)	1,2
C. Susp. irradiée + susp. témoin.	5.204 (2,3)		4.110 (3,4)	0,4	8.025 (3,7)	1,1
D. Coli irradiés lavés.	4.462 (5,1)		3.235 (5,4)	0,3	9.100 (4,2)	1,2
E. Coli irradiés lavés + susp. témoin.	5.501 (3,2)		3.345 (6,1)	0,3	8.820 (4,3)	1,2
F. Liq. surn. suspension irradiée + suspension té- moin.	989 (2,7)		9.450 (4,4)	0,9	10.550 (3,2)	1,5
G. Liq.surn.U.V. + coli irradiés lavés.	4.503 (4,4)		363 (5,7)	0,04	4.825 (3,0)	0,7

Après vingt-quatre heures, la culture des bacilles irradiés (B) est moins riche que celle des bacilles témoins (A). Mélangés avec les bacilles témoins (tube C), les bacilles irradiés empêchent ceux-ci d'atteindre leur concentration normale. Après quarante-huit heures, les cultures B et C ont rejoint ou dépassé la richesse de la culture A.

Les bacilles irradiés inhibent donc la multiplication des bacilles témoins.

EXPÉRIENCE 5. — L'inhibition décrite dans l'expérience n° 4 n'est pas due à la simple présence de nombreuses cellules mortes (ou non viables).

En effet, au lieu d'employer une suspension de bacilles irradiés, utilisons une suspension d'*E. coli* B tuée par la chaleur (trente minutes à 57°) ou par les vapeurs du chloroforme. Comme dans l'expérience 4, on mélange avec 3 ml de bouillon chauffé à 37° :

Dans le tube n° 1 : 3 ml de suspension d'*E. coli* B vivant, diluée 10^{-6} .

Dans le tube n° 2 : 3 ml de suspension de bacilles tués par chauffage et 0,3 ml de la suspension vivante précédente diluée $10^{-5} \times 1/2$.

Dans le tube n° 3 : 3 ml de suspension tuée par le chloroforme, et 0,3 ml de la suspension vivante diluée $10^{-5} \times 1/2$.

Les semences vivantes sont donc identiques. Après vingt-quatre heures de bain-marie à 37°, les concentrations en germes viables dans les tubes 2 et 3 ne sont pas inférieures à celles du tube témoin n° 1. Dans un essai, on trouve, par exemple.

Tube 1 : $1\ 085 \times 10^6$ colonies par millilitre ($V = 2,3$).

Tube 2 : $1\ 103 \times 10^6$ colonies par millilitre ($V = 3,1$).

Tube 3 : $1\ 049 \times 10^6$ colonies par millilitre ($V = 2,8$).

On peut donc conclure que, dans les tubes B et C de l'expérience n° 4, ce ne sont pas les bactéries mortes qui inhibent la multiplication des bactéries vivantes.

EXPÉRIENCE 6. — Le principe inhibiteur présent dans la suspension irradiée d'*E. coli* est-il contenu dans les corps microbiens ou bien diffuse-t-il dans le liquide où ils baignent ?

De la suspension irradiée pendant trois minutes de l'expérience 4, une partie est centrifugée pour séparer les corps microbiens du liquide (dix minutes à 5 500 tours/minute). Le dépôt cellulaire est lavé deux fois dans de l'eau salée (NaCl, 0,9 p. 100). Toutes ces centrifugations se font à froid (+ 4° C) et dans l'obscurité. Les cellules sont mises en suspension dans un volume d'eau salée égal au 1/10 du volume initial. On emploie 0,3 ml de cette suspension concentrée pour ensemer le tube G (contenant 6 ml), sans modifier son volume de manière appréciable ; 3 ml de la dilution au 1/10 de la suspension concentrée servent à ensemer les tubes D et E.

D'autre part, le liquide surnageant décanté après la centrifugation de la suspension irradiée, a été passé sur filtre Seitz ; une culture de contrôle montre que le filtrat est stérile.

Quatre tubes contenant 3 ml de bouillon chauffé à 37° reçoivent donc :

D : 3 ml de la suspension concentrée de bacilles irradiés et lavés, diluée au 1/10 ;

E : 3 ml de la même suspension diluée au $1/10 + 0,3$ ml de la suspension de bacilles témoins, non irradiés, à la dilution $1/2 \times 10^{-5}$;

F : 3 ml du liquide surnageant (suspension U. V. centrifugée), filtré + 0,3 ml de suspension témoin, diluée $1/2 \times 10^{-5}$;

G : 3 ml de liquide surnageant filtré + 0,3 ml de suspension concentrée des bacilles U. V. lavés.

Les tubes D, E et G reçoivent ainsi le même nombre de bacilles irradiés que le tube C de l'expérience 4, mais ces bacilles ont été lavés ; les tubes E et F reçoivent le même nombre de bacilles non irradiés, que le tube A de l'expérience 4.

Des numérations des germes capables de former des colonies sont exécutées immédiatement et après vingt-quatre et quarante-huit heures d'incubation à 37° dans l'obscurité. Les résultats figurent au tableau III.

On voit que les bacilles irradiés et lavés se comportent comme les bacilles irradiés non lavés : ils n'atteignent pas en vingt-quatre heures (tube D) la concentration de la culture témoin (tube A) ; ils empêchent les bacilles témoins d'atteindre cette concentration (tube E). Le liquide où ces bacilles irradiés avaient baigné ne possède pas de propriété inhibitrice (tube F). La suspension irradiée reconstituée par mélange des cellules lavées et du liquide surnageant filtré (tube G) semble encore moins capable d'atteindre la concentration de la culture témoin (A) que les tubes B et D : dans plusieurs expériences, où les concentrations de B et D à vingt-quatre heures étaient trois à cinq fois moins élevées que celles du témoin A, les concentrations de G étaient environ trente fois moins élevées que celles-ci.

La propriété de la suspension irradiée trois minutes, d'inhiber la multiplication des bactéries non irradiées, paraît appartenir aux bacilles eux-mêmes.

EXPÉRIENCE 7. — Pour des motifs qui seront exposés plus tard, nous avons étudié des variants d'*E. coli* B et K12, résistants à la streptomycine (rS), à la tétracycline (rT) ou à des bactériophages. Après irradiation par les ultra-violets et mélange avec du bouillon, ces variants se réactivent rapidement à l'obscurité et à 37° , comme les souches-mères sensibles [7]. Mais le variant rT d'*E. coli* B présente en outre les caractères suivants.

Comme tous les variants d'*E. coli* résistants à la tétracycline. BrT donne une culture maigre sur gélose nutritive contenant $50 \mu\text{g}$ de chlorhydrate de tétracycline par millilitre. Les colonies sont petites, difficiles à distinguer. Elles sont plus grosses si on se contente d'ajouter 2 à $5 \mu\text{g}$ de l'antibiotique par millilitre. Dans la présente expérience, la concentration de $2,5 \mu\text{g}$ par millilitre

sera utilisée. Sur une telle gélose, BrT, bien que résistant, forme souvent un peu moins de colonies que sur gélose sans tétracycline (80 à 100 p. 100). La souche sensible n'est capable que d'y former 1 à 10 colonies pour 10^9 cellules ensemencées.

Une suspension bien homogène de BrT est divisée en deux parties : l'une est soumise aux ultra-violets pendant trois minutes, puis mélangée avec un volume égal de bouillon à 37° ; l'autre, témoin, n'est pas irradiée, mais diluée 10^{-6} en solution salée physiologique, puis mélangée avec un volume égal de bouillon à 37°. A titre de comparaison, une suspension de la souche-mère d'*E. coli* B, sensible, est traitée de manière identique (tableau IV).

TABLEAU IV. — Multiplication d'*E. coli* B sensible et de BrT non irradiés ou soumis trois minutes aux U. V.

Souches :	Suspensions : ou Cultures.	Bactéries non irradiées :			U.V. 3 minutes.		
		Nombre de colonies :	Rap- port	T/O	Nombre de colonies :	Rap- port	T/O
		gélose "O" :	gélose T :		gélose "O" :	gélose T :	
B sensible :	Suspension :	3598×10^6	0	0	5.325	0	0
		(1,9)			(2,1)		
	Culture- bouillon :	16875	0	0	14.750	0	0
	30 minutes.	(3,2)			(2,8)		
:	Culture- bouillon :	1321×10^5	3	10^{-9}	103×10^6	1	10^{-8}
	24 heures.	(2,2)			(4,5)		
BrT :	Suspension :	425×10^6	366×10^6	0,8	108	1.775	16
		(3,0)	(3,2)		(6,2)	(1,1)	
	Culture- bouillon :	252	302	1,2	139	4.035	29
	30 minutes.	(5,3)	(4,1)		(7,0)	(2,1)	
:	Culture- bouillon :	225×10^6	205×10^6	0,9	99×10^6	92×10^6	1
	24 heures.	(0,8)	(1,2)		(1,1)	(0,9)	

Avant le mélange avec le bouillon et après trente minutes et vingt-quatre heures de culture à 37°, on ensemence des quantités aliquotes de toutes les suspensions sur gélose nutritive ordinaire (gélose O) et sur gélose additionnée de 2,5 µg de chlorhydrate de tétracycline par millilitre (gélose T). On compte les colonies développées après deux jours d'étuve à 37°, et on calcule le rapport T/O, c'est-à-dire le rapport entre le nombre de colonies sur gélose T et celui des colonies sur gélose O.

Après comme avant l'irradiation, la suspension de la souche sensible ne forme pratiquement pas de colonies sur gélose T. La suspension de la souche rT non irradiée forme presque autant de colonies sur gélose T que sur gélose O ; le rapport T/O est égal à 0,8. Mais, lorsque cette suspension a été irradiée, le nombre de

colonies sur gélose T est beaucoup plus grand que sur gélose O : le rapport T/O est de 16.

Après trente minutes de culture en bouillon (moment où la réactivation des suspensions irradiées est manifeste), le rapport T/O pour BrT est proche de l'unité lorsque les bacilles n'avaient pas été irradiés, mais vaut 29 lorsqu'ils avaient été irradiés.

Après vingt-quatre heures de culture, lorsque la réactivation s'est effacée devant la multiplication véritable, le rapport T/O revient à l'unité, aussi bien pour BrT irradié que pour BrT témoin.

D'autres essais aboutissent à des résultats semblables (Linz [5]) : la souche BrT forme dix à trente fois plus de colonies sur gélose T que sur gélose O, à condition d'avoir été soumise d'abord aux ultra-violets pendant une à dix minutes ; cette propriété se manifeste de suite après l'irradiation ou après trente minutes à 37° (pendant la réactivation), mais n'existe plus après dix-huit à vingt-quatre heures de culture. Elle disparaît donc avec la multiplication des bactéries. D'ailleurs, les subcultures de BrT irradié fournissent un rapport T/O = 1.

D'autres variants d'*E. coli* B rendus résistants à la tétracycline se comportent comme le variant ci-dessus. Par contraste, aucun des variants d'*E. coli* K12 résistants à la tétracycline, irradiés ou non, ne forme plus de colonies sur gélose T que sur gélose O.

Les variants, tant d'*E. coli* B que d'*E. coli* K12, résistants à la streptomycine ou à la néomycine, irradiés ou non, donnent le même nombre de colonies sur gélose additionnée, suivant le cas, de streptomycine ou de néomycine, que sur gélose sans antibiotique.

EXPÉRIENCE 8. — Pourquoi BrT irradié forme-t-il dix à trente fois plus de colonies sur gélose T que sur gélose O ? Les ultra-violets ont-ils provoqué la « transformation » de cellules résistantes en cellules dépendantes de la tétracycline, de sorte que celles-ci ne se développent que sur gélose T ?

On reprend les flacons de gélose T de l'expérience précédente, où BrT avait étéensemencé aussitôt après l'irradiation ou après trente minutes de bouillon à 37° : on prélève des parcelles de 100 colonies choisies au hasard et on les ensemence sur de la gélose O, d'une part, et sur de la gélose T, d'autre part. Un développement normal est obtenu sur les deux milieux.

Des parcelles de dix des colonies sont émulsionnées dans de l'eau stérile, et des dilutions convenables sont incorporées à de la gélose O et à de la gélose T. Le nombre des colonies obtenues sur chacune est semblable.

Tout se passe donc comme si ces colonies étaient résistantes mais non pas dépendantes ; il faut remarquer que les colonies de BrT sur gélose T n'ont été utilisées qu'après deux jours d'étuve à 37° ; or, on sait que les dépendants subissent aisément une mutation régressive les ramenant au stade de la résistance simple. Aussi, dans une expérience semblable à l'expérience n° 7 (BrT irradié : rapport T/O = 12), les flacons de gélose T furent observés fréquemment pendant leur incubation. Dès que des colonies de BrT irradié y furent perceptibles (vingtième heure), une vingtaine furent prélevées etensemencées sur gélose O et sur gélose T : toutes fournirent un développement identique sur les deux milieux.

Ceci ne lève pas complètement l'objection de la mutation régressive, mais la rend peu probable. Il semble qu'on puisse admettre que l'irradiation n'a pas transformé des bactéries résistantes en dépendantes.

DISCUSSION.

Les cellules d'*E. coli*, souches B et K12, traitées par les rayons ultra-violets, se réactivent en bouillon nutritif, à 37°, et dans l'obscurité. La réactivation s'accélère pendant l'incubation, mais, après deux heures environ, la multiplication véritable se superpose à la réactivation. A partir de ce moment, la multiplication des bacilles témoins, non irradiés, est plus rapide, et leur culture dépasse bientôt l'autre en richesse : après vingt à vingt-quatre heures, elle est trois à douze fois plus riche. Plus tard, la mortalité normale atteint la culture témoin ; elle semble ne pas affecter la culture des bacilles irradiés : à la fin de la deuxième journée d'incubation, la culture témoin est devenue moins riche, tandis que la culture des bacilles irradiés n'a plus guère varié.

L'incapacité des bacilles irradiés d'atteindre en un jour de culture la même concentration que les bacilles témoins n'est pas due à une lésion héréditaire des cellules : en effet, leurs cultures-filles sont aussi riches que les cultures témoins (expérience 3).

La suspension irradiée d'*E. coli* B contient un principe qui inhibe la multiplication des bacilles non irradiés. Son filtrat (filtre de Seitz) est inactif, mais les bactéries irradiées et lavées restent inhibitrices. On doit donc conclure, ou bien que le principe inhibiteur diffuse difficilement hors des corps cellulaires, ou bien qu'il est absorbé par les filtres de Seitz.

Roberts et Aldous [8] déjà ont constaté que la division cellulaire s'arrête et que des filaments géants se forment dans les cultures des bactéries irradiées. Ils attribuent ces effets à une toxine que l'irradiation ferait apparaître dans la suspension. Nos propres expériences sont également en faveur de l'existence d'un principe toxique, mais nous ne l'avons pas isolé.

Lorsqu'on traite par les ultra-violets une suspension de variants d'*E. coli* B résistants à la tétracycline (BrT), cette suspension fournit dix à trente fois plus de colonies sur gélose additionnée de chlorhydrate de tétracycline (2,5 µg par millilitre) que sur gélose sans antibiotique. La différence entre les deux milieux persiste après trente minutes de réactivation en bouillon à 37° et à l'obscurité. Elle disparaît lorsque la culture en bouillon de BrT irradié est âgée de 20 à 24 heures. Or, à ce moment, la réactivation s'est effacée devant la multiplication véritable, et l'on a affaire à la descendance des cellules irradiées. Cette descendance reprend les propriétés normales de la souche et ne forme pas plus de colonies sur gélose avec tétracycline que sur gélose sans antibiotique ; ses subcultures restent normales également. Il faut conclure que la propriété de fournir plus de colonies sur gélose T que sur gélose O est un apanage des cellules de BrT au moment de la réactivation.

Cette propriété est d'autant plus remarquable que la souche BrT forme des colonies plus grosses et un peu plus nombreuses sur gélose sans antibiotique que sur gélose avec tétracycline.

Quant à la souche K12rT, traitée ou non par les ultra-violets, elle fournit pratiquement le même nombre de colonies sur les deux milieux.

Il est peu vraisemblable que l'irradiation par les ultra-violets ait transformé les cellules de BrT, résistantes, en cellules dépendantes de la tétracycline. Les colonies développées sur gélose T sont composées de résistants véritables. Pour admettre les transformations de résistants en dépendants, il faut supposer que le caractère dépendant se perd très rapidement de nouveau, même sur un milieu additionné de tétracycline, avant que des colonies soient visibles. Cela paraît improbable et l'hypothèse de la transformation en dépendants doit être rejetée.

Il existe des ressemblances frappantes entre les observations de Gillies et Alper [1, 2] et celles que nous avons faites sur le variant rT de la souche B d'*E. coli*, irradié, réactivé et ensemencé sur gélose contenant de la tétracycline. Gillies et Alper ont soumis des suspensions d'*E. coli* B à des rayons ultra-violets, à des rayons X ou à des neutrons. Les suspensions ainsi traitées fournissent plus de colonies sur un milieu de culture pauvre que sur un milieu riche ; elles en fournissent plus également sur le milieu riche si cette culture est précédée par quelques heures d'incubation sur gélose additionnée de chloramphénicol. Okagaki a confirmé ces expériences [7]. Gillies et Alper croient que des conditions de croissance sub-optima favorisent la réactivation des bacilles irradiés. « L'inhibition de la formation de colonies après irradiation », disent-ils, « est due en partie à une lésion qui provoque un déséquilibre du processus de synthèse de la culture, de

sorte que la réactivation ou la « restauration » puissent être déterminées par des conditions de culture sub-optima ». Ces conditions empêcheraient le déséquilibre des processus de synthèse de se manifester et permettraient aux cellules de se multiplier. Notons qu'entre les mains de Gillies et Alper, non plus, la souche K12 d'*E. coli* ne présente le phénomène décrit pour la souche B.

Si l'on applique l'interprétation de Gillies et Alper à nos observations, la gélose avec tétracycline, moins favorable au variant BrT que la gélose sans antibiotique, empêcherait un « déséquilibre de synthèse » de se manifester.

On peut ne pas être convaincu par la théorie de Gillies et Alper. Mais les phénomènes décrits par eux et ceux que nous venons d'exposer sont certainement provoqués par des mécanismes très semblables, sinon identiques.

CONCLUSIONS.

1° Des suspensions d'*E. coli*, souches B et K12, traitées par les rayons ultra-violet, puis mélangées avec du bouillon, se réactivent à l'obscurité et à 37°. Les cultures âgées d'un jour sont trois à douze fois moins riches que les cultures témoins des germes non irradiés.

2 Cette pauvreté relative n'est pas due à une lésion héréditaire des cellules irradiées, mais à un principe inhibiteur formé au cours de l'irradiation. Le principe réside dans les cellules irradiées elles-mêmes et ne paraît pas diffusible ou filtrable.

3° Le variant d'*E. coli* B résistant à la tétracycline forme, après irradiation, dix à trente fois plus de colonies sur gélose additionnée de tétracycline que sur gélose sans antibiotique. Cette propriété persiste pendant toute la réactivation, mais se perd lorsque la multiplication véritable en bouillon masque celle-ci. Le variant d'*E. coli* K12 résistant à la tétracycline ne possède pas la même propriété.

SUMMARY

REACTIVATION OF *E. coli* AFTER TREATMENT BY U. V.

1. Suspensions of *E. coli* B and K12, treated by U. V. and mixed with culture broth, are reactivated in the dark at 37° C. One day-old cultures are three to twelve times less abundant than non-irradiated control cultures.

2. This is not due to an hereditary lesion of irradiated cells, but to an inhibitory factor, which appears during irradiation. This factor is localized in the cells and does not seem to be diffusible or filterable.

3. After irradiation the tetracyclin-resistant *E. coli* B variant yields ten to thirty times more colonies on agar + tetracyclin than on agar without antibiotic. This property persists during the whole reactivation, but is lost when the actual multiplication in broth masks the reactivation. The tetracyclin-resistant *E. coli* K12 variant does not possess the same property.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALPER (T.) et GILLIES (N. E.). *J. gen. Microbiol.*, 1958, **48**, 461-472.
 - [2] GILLIES (N. E.) et ALPER (T.). *Nature*, 1959, **483**, 237-238.
 - [3] KELNER (A.). *J. Bact.*, 1949, **58**, 511-522.
 - [4] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1958, **452**, 1599-1601.
 - [5] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1959, **453**, 373-376.
 - [6] LINZ (R.), *C. R. Soc. Biol.*, 1959, **453**, 1076-1079.
 - [7] OKAGAKI (H.). *J. Bact.*, 1960, **79**, 277-291.
 - [8] ROBERTS (R. B.) et ALDOUS (E.). *J. Bact.*, 1949, **57**, 363-375.
 - [9] SZYBALSKI (W.) et BRYSON (V.). *J. Bact.*, 1952, **64**, 489-499.
-

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE MESURE DE LA SENSIBILITÉ DES BACILLES TUBERCULEUX AUX ANTIBIOTIQUES PRÉSENTS DANS LE SÉRUM DES MALADES

par J. AUDRIN.

(Laboratoire du Sanatorium Rhône-Azur, Briançon [Htes-Alpes])

A la lecture du compte-rendu du VIII^e Symposium international de la Tuberculose, une phrase du professeur Daddi nous avait frappé, phrase qui reflète l'opinion d'un grand nombre de cliniciens : « On devrait étudier l'utilisation du médicament par chaque malade, et le comportement des bacilles de Koch *in vitro* en présence des concentrations que ce médicament peut atteindre dans le sang du malade lui-même ». C'est à ce problème technique que nous nous sommes attaqué et c'est une solution possible que nous décrirons dans ce travail.

1^o CHOIX DU MILIEU.

De même que pour les mesures classiques de résistance, nous avons :

a) préféré au milieu liquide le milieu solide qui se souille moins facilement et sur lequel on peut apprécier le nombre de colonies qui y poussent ;

b) inclus la solution d'antibiotique (c'est-à-dire le sérum) dans la masse du milieu avant la coagulation.

Pour cela, il fallait savoir s'il était possible d'ajouter du sérum au milieu de Jensen, et quelle quantité, afin que la culture du bacille tuberculeux se fasse et que la coagulation du milieu soit correcte. Nous avons, dans 6 tubes stériles, mis 0, 1, 2, 3, 4, et 5 ml de sérum de bœuf filtré auxquels nous avons rajouté respectivement 6, 5, 4, 3, 2 et 1 ml de milieu de Jensen liquide.

Ces tubes, après coagulation pendant 20 min à 84° C (ce temps

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 juin 1960.

a été suffisant pour obtenir une coagulation égale dans tous les tubes) ont été ensemencés avec une suspension de la souche H37Rv sensible.

Les résultats se trouvent dans le tableau I.

TABLEAU I.

Tube	Jensen	Sérum	Pourcentage de Sérum	Intensité de la culture
Témoin	6 ml	0 ml	0 %	+ + + +
1	5 ml	1 ml	17 %	+ + + +
2	4 ml	2 ml	33 %	+ + + +
3	3 ml	3 ml	50 %	+ + + +
4	2 ml	4 ml	66 %	+ + +
5	1 ml	5 ml	83 %	+ +

On voit que, sur le milieu qui contient jusqu'à 50 p. 100 de sérum, la culture des bacilles est aussi intense que sur le témoin. La morphologie des colonies est légèrement différente : les colonies qui poussent sur le milieu au sérum sont plus lisses et moins pigmentées.

2° EXPÉRIENCE DE BASE.

Chez 2 malades, après une perfusion de 1 g de DHS panthoténique et de 500 mg d'isoniazide dans 500 ml de PAS IV, nous avons prélevé du sérum deux heures, quatre heures et neuf heures après la fin de la perfusion.

Nous avons dilué chacun de ces deux échantillons de sérum dans les proportions suivantes : 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 avec du sérum de bœuf filtré. Dans des tubes numérotés de 1 à 5, nous avons placé 1 ml de chacune de ces dilutions et nous y avons ajouté 5 ml de milieu de Jensen.

Les concentrations finales de sérum dans les différents tubes sont les suivantes :

Tube n° 1	1/6
Tube n° 2	1/12
Tube n° 3	1/24
Tube n° 4	1/48
Tube n° 5	1/96

Après mélange et coagulation, nous avonsensemencé les 2 séries de tubes avec la souche de chaque malade.

La souche du premier malade était entièrement sensible à la streptomycine, au PAS et à l'INH.

La deuxième souche, par contre, était très fortement résistante à ces trois antibiotiques :

DHS	plus de 50 $\mu\text{g/ml}$
PAS	plus de 1 $\mu\text{g/ml}$
INH	plus de 5 $\mu\text{g/ml}$

Les résultats se trouvent dans le tableau II (lecture vingt jours après l'ensemencement).

TABLEAU II.

Tube	Concentrations de sérum	Souche sensible			Souche résistante		
		2 H.	4 H.	9 H.	2 H.	4 H.	9 H.
Témoin	0	+++	+++	+++	+	+++	+++
1	1/6	-	-	-	++	+++	+++
2	1/12	-	-	-	+++	+++	+++
3	1/24	-	-	-	+++	+++	+++
4	1/48	-	-	-	+++	+++	+++
5	1/96	-	-	-	+++	+++	+++

Le sérum du malade, dont la souche est sensible, est capable, neuf heures après la fin de la perfusion, d'inhiber complètement, à une dilution de 1/96 la culture des bacilles expectorés par le malade.

Par contre, la souche du malade résistant n'est pas entièrement inhibée par le sérum, à une concentration de 1/6, prélevé deux heures après la fin de la perfusion.

Comme on le voit, il s'agit là d'une véritable mesure de la sensibilité aux antibiotiques qui se trouvent dans le sang du malade.

3° NOUS AVONS POURSUIVI NOS ESSAIS non pas, comme dans l'expérience précédente, en étudiant des mélanges d'antibiotiques, mais au contraire en les dissociant.

Nous nous sommes, pour le moment, limité à la DHS et à l'INH.

A. INJECTION DES ANTIBIOTIQUES. — Nous avons préféré, pour des raisons pratiques, injecter les antibiotiques par voie intramusculaire aux doses habituellement utilisées au Sanatorium Rhône-Azur :

DHS	1 g
INH	500 mg

B. PRÉLÈVEMENT DU SANG. — Des essais préliminaires nous ont montré que, si l'on effectuait des prélèvements deux heures, quatre heures et sept heures après l'injection intramusculaire de DHS ou d'INH, c'était au prélèvement de la deuxième heure que le taux des antibiotiques dans le sérum était le plus élevé.

Nous avons donc décidé de faire les prélèvements à ce moment-là.

C. DÉTERMINATION DE LA GAMME DE DILUTIONS DE SÉRUM A UTILISER.

1° *L'isoniazide*. — Deux heures après l'injection de 500 mg d'INH, nous avons prélevé du sérum chez 4 malades.

Chaque sérum a été dilué avec du sérum de bœuf dans les proportions suivantes : de 1 à 1/64.

A 1 ml de chacune de ces dilutions, on a ajouté 5 ml de milieu de Jensen, ce qui donne des dilutions terminales de sérum de 1/16 à 1/384 (tableau III).

TABLEAU III.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	Témoin
Dilutions de sérum	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Sérum de Bœuf
<div style="text-align: center;"> 1 ml ↓ + JENSEN : 5 ml </div>								
Dilutions Terminales	1/6	1/12	1/24	1/48	1/96	1/192	1/384	0

Après coagulation pendant vingt minutes à 84° C, l'ensemencement a été effectué avec une souche H37Rv entièrement sensible.

Les résultats sont exposés dans le tableau IV.

Chez les 4 malades, la souche n'a pas poussé sur le tube n° 5 qui contient 1/96 de sérum, et chez 2 malades seulement on a vu apparaître au 20^e jour des colonies sur le tube n° 6 qui contient 1/192 de sérum.

On peut donc, pour l'INH, utiliser cette gamme : témoin, 1/6, 1/12, 1/24, 1/48, 1/192 et 1/384.

2° *La streptomycine.* — Le bacille tuberculeux étant moins sensible à la streptomycine qu'à l'isoniazide, il est évident qu'il faudra, pour cet antibiotique, obtenir des concentrations dans le sérum plus fortes que pour l'isoniazide.

Nous avons donc, chez 4 autres malades, après injection intra-

TABLEAU IV.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	Témoin
Dilutions	1/6	1/12	1/24	1/48	1/96	1/192	1/384	0
MALADE A	10J 20J	- -	- -	- -	- -	- ++	++ +++	+++ +++
MALADE B	10J 20J	- -	- -	- -	- -	- -	+++ +++	+++ +++
MALADE C	10J 20J	- -	- -	- -	- -	- ++	++ +++	+++ +++
MALADE D	10J 20J	- -	- -	- -	- -	- -	++ +++	+++ +++

musculaire de 1 g de DHS panthoténique, prélevé du sérum que nous avons dilué avec du sérum de bœuf, comme précédemment.

Mais de chacune de ces dilutions, nous avons pris 3 ml auxquels nous avons rajouté 3 ml de milieu de Jensen.

Les dilutions terminales de sérum vont donc ici de 1/2 à 1/128 (tableau V).

TABLEAU V.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	Témoin
Dilutions de sérum	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Sérum de bœuf
<div style="text-align: center;"> 3 ml ↓ + JENSEN + 3 ml </div>								
Dilutions Terminales	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	0

Après coagulation et ensemencement avec la souche H37Rv, nous avons observé les résultats rapportés dans le tableau VI.

Des colonies n'ont poussé que sur les tubes n° 7 et n° 6, qui contiennent respectivement 1/128 et 1/64 de sérum.

On utilisera donc cette gamme.

TABLEAU VI.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	mémoir
Dilutions	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	0
MALADE A'	10j -	-	-	-	-	++	+++	+++
	20j -	-	-	-	-	+++	+++	+++
MALADE B'	10j -	-	-	-	-	-	+++	+++
	20j -	-	-	-	-	-	+++	+++
MALADE C'	10j -	-	-	-	-	-	+++	+++
	20j -	-	-	-	-	++	+++	+++
MALADE D'	10j -	-	-	-	-	++	+++	+++
	20j -	-	-	-	-	+++	+++	+++

D. APPLICATION A LA MESURE DE LA RÉSISTANCE DES BACILLES TUBERCULEUX AUX ANTIBIOTIQUES. — Le protocole est le suivant :

Le malade voit son traitement habituel par les antibiotiques arrêté pendant quarante-huit heures.

Le premier jour suivant, deux heures après une injection intramusculaire de 1 g de DHS pantothénique, on prélève stérilement au moins 20 ml de sang.

Le deuxième jour suivant, deux heures après l'injection de 500 mg d'INH, on prélève stérilement une dizaine de ml de sang.

Avec les sérums on prépare, comme nous venons de l'indiquer, des dilutions auxquelles on ajoute le milieu de Jensen, et on fait coaguler. Avec chaque sérum, on fabrique ainsi 2 séries de tubes :

a) La première estensemencée avec la souche H37Rv ; elle sert à apprécier l'activité antibiotique du sérum.

b) La deuxième série estensemencée avec la souche du malade lui-même ; elle sert à mesurer la sensibilité de cette souche aux concentrations de l'antibiotique présentes dans le sang du malade.

La comparaison entre la première et la deuxième série indique la sensibilité de la souche du malade, non pas exprimée par le chiffre isolé d'une concentration inhibitrice, mais, ce qui est plus important, par rapport à la sensibilité de la souche standard H37Rv.

Les résultats peuvent donc être exprimés sous la forme d'une fraction, dont le numérateur est le chiffre de la dilution du dernier

tube où aura poussé la souche témoin et le dénominateur le chiffre de la dilution du dernier tube où aura poussé la souche du malade.

La quantité d'antibiotique présente dans le sang du malade est d'autant plus grande que le numérateur est plus fort, et la résistance de la souche est d'autant plus importante que le rapport est plus élevé.

Nous appellerons ce rapport S/M (souche sensible/souche malade).

4° COMPARAISON AVEC LA MÉTHODE CLASSIQUE.

La méthode classique que nous utilisons est celle-ci :

Le milieu, après inclusion de l'antibiotique dans la masse, est réparti dans des tubes de 17×170 qui sont coagulés à 84° C pendant vingt minutes. Ces tubes sont ensemencés avec des dilutions de souches d'une richesse telle que l'on obtienne environ 500 colonies sur les tubes témoins (il s'agit donc d'un ensemencement relativement pauvre).

Nous faisons deux lectures : au 10^e et au 20^e jour.

Pour la streptomycine, nous utilisons la gamme suivante : témoin, 2, 5, 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$ de milieu, et pour l'isoniazide : témoin, 0,1, 0,2, 1 et 5 $\mu\text{g/ml}$.

Nous considérons comme encore sensibles les souches qui poussent au 10^e jour en présence de 2 μg de streptomycine et 0,1 d'INH, ou qui donnent quelques colonies au 20^e jour en présence de 5 μg de DHS et 0,2 μg d'INH.

Sont déjà résistantes les souches qui poussent au 10^e jour sur 5 μg de DHS et sur 0,2 μg d'INH.

Nous avons mesuré par cette méthode et par la méthode au sérum la sensibilité de 16 souches de bacilles tuberculeux isolées à partir de crachats recueillis par tubage gastrique.

Les résultats de cette comparaison sont résumés dans le tableau VII.

Nous n'indiquons, pour ne pas trop compliquer le tableau, que les lectures faites vers le 10^e jour.

Dans la colonne S nous avons noté les chiffres des concentrations maxima de sérums en présence desquelles a poussé la souche H37Rv, et dans la colonne M les chiffres des concentrations maxima en présence desquelles ont poussé les souches des malades.

5° DISCUSSION.

De l'étude du tableau VII ressortent les faits suivants :

a) Il semble que lorsque le taux des antibiotiques dans le sérum deux heures après leur injection est normal, la culture de la souche témoin ait lieu seulement sur les tubes 128 ou 64 pour la streptomycine et sur les tubes 384 ou 192 pour l'isoniazide.

Lorsque la culture a lieu en présence de dilutions plus faibles, il y a vraisemblablement une mauvaise concentration de l'antibiotique dans l'organisme.

TABLEAU VII.

SOUCHE	STREPTOMYCINE				ISONIAZIDE			
	RESISTE A :	S	M	S/M	RESISTE A :	S	M	S/M
N° 1: FO	-	-	-	-	< 0,1 μ g	384	192	2
N° 2: AR	> 50 μ g	128	4	32	0,2 μ g	192	6	32
N° 3: AL	-	-	-	-	< 0,1 μ g	384	384	1
N° 4: AU	10 μ g	64	8	8	< 0,1 μ g	192	384	< 1
N° 5: BL	> 50 μ g	64	4	16	> 5 μ g	96	6	> 16
N° 6: SA	10 μ g	32	4	8	> 5 μ g	192	12	16
N° 7: PR	-	-	-	-	> 5 μ g	384	6	64
N° 8: VE	< 2 μ g	128	64	2	< 0,1 μ g	384	384	1
N° 9: KR	> 50 μ g	128	4	32	1 μ g	192	6	32
N° 10: CL	< 2 μ g	128	> 128	< 1	< 0,1 μ g	384	384	1
N° 11: CA	50 μ g	64	2	32	0,2 μ g	192	6	32
N° 12: DA	2 μ g	128	128	1	< 0,1 μ g	384	384	1
N° 13: RI	< 2 μ g	128	128	1	< 0,1 μ g	384	192	2
N° 14: SOL	10 μ g	128	16	8	< 0,1 μ g	384	384	1
N° 15: SOU	2 μ g	64	32	2	< 0,1 μ g	384	384	1
N° 16: BE	50 μ g	128	8	16	0,2 μ g	192	6	32

C'est le cas ici d'une souche pour la DHS (souche n° 6) et d'une souche pour l'INH (souche n° 5).

b) Le rapport S/M est normal, donc la souche M sensible à l'antibiotique, lorsqu'il est plus petit que 1, ou égal à 1, à 2 ou à 4.

C'est le cas pour la DHS de 5 souches (souches n^{os} 8, 10, 12, 13 et 15) et pour l'INH de 9 souches (souches n^{os} 1, 3, 4, 8, 10, 12, 13, 14 et 15). Il y a dans tous ces cas-là concordance étroite avec les résultats fournis par la méthode classique.

c) On peut dire que la souche M est résistante lorsque S/M est supérieur ou égal à 16.

Pour la DHS, il y a concordance avec l'antibiogramme classique dans 5 cas (souches n^{os} 2, 5, 9, 11 et 16). Il n'y a pas de discordance. Pour l'INH, il y a concordance dans les 6 cas (souches n^{os} 2, 6, 7, 9, 11 et 16).

d) Il est vraisemblable qu'un rapport S/M égal à 8 correspond à une souche déjà résistante.

C'est, pour la DHS, le cas des souches n^{os} 4 et 14, souches qui résistent toutes deux à 10 μ g/ml.

e) Signalons que nous ne pouvons pas déduire des résultats donnés par les séries ensemencées avec la souche H37Rv la quantité d'antibiotique présente dans le sérum des malades, ne sachant pas encore quelles sont les doses minima inhibitrices d'antibiotiques dans ce milieu de Jensen atypique.

CONCLUSION.

Ces premiers résultats nous encouragent à poursuivre nos essais. En effet, seule une comparaison avec la méthode classique portant sur un assez grand nombre de souches pourra nous dire quel est vraiment l'intérêt de cette méthode.

RÉSUMÉ.

Description d'une méthode originale qui permet de mesurer la sensibilité de la souche des bacilles tuberculeux d'un malade aux antibiotiques présents dans le sang de ce malade.

A des dilutions successives du sérum prélevé après l'injection intramusculaire de dihydrostreptomycine ou d'INH, on ajoute du milieu de Jensen avant la coagulation.

Pour chaque antibiotique et chaque malade, on fabrique deux séries jumelles, dont l'une est ensemencée avec la souche H37Rv et la seconde avec la souche du malade.

Les résultats renseignent :

1° Sur la quantité d'antibiotique qui se trouve dans le sang du malade.

2° Sur la sensibilité de la souche du malade relativement à celle de la souche H37Rv.

SUMMARY

DESCRIPTION OF A TECHNIQUE ALLOWING TO EVALUATE THE SENSITIVITY OF T. B. TO THE ANTIBIOTICS PRESENT IN PATIENTS' SERA.

Description of this new method.

To serial dilutions of the patients's serum taken after intramuscular injection of dihydrostreptomycin or INH, Jensen's medium is added before coagulation.

For each antibiotic and each patient two identical series are prepared, one being seeded with the H37Rv strain, the other with the patient's strain.

Information is thus obtained :

1. On the amount of antibiotic present in the patient's blood.
2. On the sensitivity of the patient's strain comparatively with the sensitivity of the H37Rv strain.

BIBLIOGRAPHIE

La valeur clinique des mesures de résistance bactérienne. VIII^e Symposium de la Tuberculose, Paris, 20 septembre 1957.

CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DU MODE DE MULTIPLICATION DU BACILLE TUBERCULEUX. LES BACILLES ACIDOPHILES

par J. DEGOMMIER (*).

(Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose
[Chef de Service : J. BRETEY])

INTRODUCTION.

Pour la clarté de notre exposé, nous rappellerons brièvement quelques données classiques sur les propriétés tinctoriales du bacille tuberculeux.

En 1882, pour découvrir le bacille qui porte son nom, Robert Koch utilisa le bleu de méthylène en solution alcoolisée et alcalinisée. Il abandonna très vite ce colorant en raison de sa tendance à se transformer en leucodérivé. Il eut alors recours au violet de gentiane, colorant du groupe des phénylméthanés. Peu après, Ehrlich [1] inaugura avec grand succès l'emploi d'un autre colorant du même groupe, la fuchsine basique. En même temps, il découvrait l'acido-alcool-résistance, caractère propre aux Mycobactéries.

Ziehl et Neelsen perfectionnèrent par la suite cette technique de coloration, qui depuis porte leurs noms. Elle est universellement connue et reste à peu près la seule employée.

Plus tard, d'autres chercheurs trouvèrent quelques variantes. Mentionnons la coloration de Hallberg [2, 3] au bleu de nuit (triphénylméthane). Citons également la coloration de Hagemann à l'auramine (diphénylméthane) pour les observations en fluorescence.

Ce qu'il faut retenir de cette brève énumération, c'est que tous ces colorants sont des *colorants basiques*. Ils ont rendu des services considérables et demeurent les seuls colorants valables pour le dépistage et l'identification certaine des Mycobactéries, notamment des bacilles tuberculeux, dans les produits pathologiques.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juillet 1960.

Classiquement, le bacille de Koch est donc un germe basophile AAR⁺.

C'est dans un but d'études morphologiques de ce même bacille que nous avons utilisé des colorants acides. Parmi ceux-ci, signalons : le vert lumière ou vert sulfo, la fuchsine acide et le bleu de méthyle ou bleu coton.

Nous avons expérimenté longtemps avec le vert lumière. Correctement appliqué à un étalement de culture pure, il est refusé par la grande majorité des bacilles, qui restent incolores, mais il en colore un petit nombre en grenat. Bien que cette métachromasie soit une propriété intéressante à retenir pour une étude ultérieure, nous l'avons trouvée gênante pour le présent travail, et avons abandonné provisoirement le vert lumière.

Quant à la fuchsine acide à laquelle nous avons eu recours pendant un certain temps, elle se transforme en leucodérivé au contact de la moindre alcalinité, ce qui retire toute garantie aux observations faites sur des colorations superposées.

En définitive, c'est le bleu de méthyle que nous avons retenu pour la suite de nos expériences. Il appartient aussi au groupe des triphénylméthanés ; c'est un bleu d'aniline polysulfoné, très soluble dans l'eau. Pour éviter toute confusion avec le bleu de méthylène, dont il diffère chimiquement, nous l'appellerons « bleu coton », comme c'est l'usage, notamment en mycologie, où il est d'un emploi courant.

L'utilisation de ces colorants acides nous a amené à constater que, dans tout étalement de culture pure, une petite proportion de bacilles se colore par les colorants acides et refuse les colorants basiques, et, qu'inversement, une très grande proportion des bacilles du même étalement accepte les colorants basiques et refuse les colorants acides.

Ce qui nous permet d'énoncer le fait qu'il existe des bacilles tuberculeux *acidophiles* et nous invite à en rechercher la signification biologique.

EXPÉRIMENTATION

SOUCHES EMPLOYÉES.

Dès le début de ces recherches nous avons espéré trouver des différences fondamentales entre, par exemple, bacilles virulents et avirulents, entre tuberculeux et paratuberculeux, entre cultures plus ou moins âgées.

Mais rien de tel ne nous est apparu clairement et, par la suite, nous nous sommes limités à expérimenter sur la seule souche H37Rv en pleine multiplication.

Notre étude revêt donc un caractère d'ordre général vis-à-vis du bacille tuberculeux ou espèces voisines, sans préjuger de

particularités qui pourraient être mises en évidence ultérieurement, notamment sur des souches plus ou moins modifiées par l'action d'antibiotiques.

ETALEMENTS.

Nous avons fait des étalements de cultures pures en Dubos, des étalements de cultures en Youmans, et également des prélèvements de voiles très jeunes (quelques jours) en Youmans appliqués sur lames. Ce sont ces derniers qui nous ont permis les observations les plus intéressantes.

Pour obtenir des applications de voiles sur lames sans modifications appréciables de leur disposition de croissance, nous avons utilisé la technique de Hauduroy décrite dans son ouvrage : *Bacilles tuberculeux et paratuberculeux* [4].

« Les cultures sont effectuées dans des vases cylindriques, dans lesquels on place d'abord une tige de verre pleine et mince, à laquelle on a donné la forme d'un triangle. Une des extrémités de cette tige est coudée à angle droit sur la partie triangulaire et remonte jusqu'au bord du vase. Ce petit appareil sert de support pour une lame porte-objet ; support et lame étant en place, on verse dans le vase le milieu de culture choisi (dans notre cas, milieu de Youmans). On bouche le vase avec un gros tampon de coton cardé, enveloppé de tarlatane, pour éviter la chute de fragments de coton. On stérilise, on enseme. Le voile microbien se forme à la surface du milieu. Pour le prélever, on opère de la façon suivante : on introduit au fond du vase l'extrémité d'une pipette coudée au préalable et qui va jouer le rôle de siphon. Le milieu de culture est ainsi enlevé doucement. Le voile bactérien descend peu à peu en même temps que le niveau supérieur du liquide et vient de lui-même se poser sur la lame. On enlève celle-ci grâce au support sur lequel elle repose. Il ne reste plus qu'à sécher, fixer et colorer ».

Pour l'ensemencement, nous posons, à la surface du milieu, un fragment de jeune voile d'environ 2 mm². Après trois jours de végétation à l'étuve, le voile couvrait une surface d'environ 1 cm².

TECHNIQUES DE COLORATION.

a) COLORATION DE BASE. — Ainsi que nous l'indiquons plus haut, nous avons retenu, comme colorant acide, le bleu coton, pour lequel nous avons mis au point la formule suivante :

Bleu coton	1 g
Eau distillée tamponnée au phosphate à pH 6	75 cm ³
Alcool à 90°	25 cm ³

On a intérêt à laisser vieillir la solution pendant plusieurs semaines.

La technique de coloration est la suivante :

- 1° Fixation par l'alcool méthylique,
- 2° Recouvrir la lame avec la solution colorante et laisser agir trente minutes à froid,
- 3° Rincer à l'eau distillée $\text{pH} < 7$.
- 4° Décolorer cinq minutes à l'alcool acide (alcool à $90^\circ + 3 \text{ p. } 100 \text{ ClH}$)
- 5° Laver à l'eau distillée $\text{pH} < 7$.
- 6° Sécher à l'air.

Après cette coloration, on peut observer les préparations en lumière blanche. On remarque alors qu'une certaine quantité de bacilles (1 p. 100 environ) a accepté et retenu, malgré la décoloration, le bleu coton. Ils se détachent en bleu foncé au sein des cordes formées par la grande majorité des bacilles, qui, elle a refusé le colorant acide. Lorsque la coloration est bien réussie, ces cordes sont incolores et délimitées par un fond bleu plus ou moins pâle constitué par un mince film de milieu de culture.

Toutefois, l'observation de ces cordes est presque toujours difficile. C'est en partie pour cette raison que nous avons superposé à cette première coloration une seconde coloration, celle-là basique.

b) COLORATION SUPERPOSÉE. — Elle consiste à faire suivre la coloration précédente d'un temps d'auramine.

- 1° Auramine OO solution aqueuse à 1 p. 1 000 : dix minutes.
- 2° Décoloration par l'alcool acide ($\text{ClH } 5 \text{ p. } 1\ 000$) : cinq minutes
- 3° Rincer à l'eau distillée $\text{pH} < 7$.
- 4° Laisser sécher à l'air.

L'APPAREILLAGE OPTIQUE.

Grâce à ces deux colorations superposées, la lame étant placée sous le microscope, on peut passer instantanément de l'examen en lumière blanche à l'examen en fluorescence, et inversement, à condition d'utiliser la lumière bleue comme source d'excitation de la fluorescence.

L'appareillage est celui que nous avons décrit dans une précédente étude [5] : microscope Dialux binoculaire de Leitz, objectif à la fluorine $\times 95$, oculaires périplans $\times 6$ (grossissement total en tenant compte du facteur 1,25 de la tête binoculaire : $95 \times 6 \times 1,25 = 712$). Immersion entre condensateurs et lame objet, et également entre lame et objectif, avec une huile non fluorescente.

Pour l'observation en fluorescence, il suffit de poser un filtre

bleu donnant un maximum de transmission dans les longueurs d'onde voisines de 4 100 Å (filtre bleu de Keller). Il peut donc être enlevé et remis instantanément.

L'objectif contient, dans sa partie supérieure, un petit disque découpé dans un filtre Wratten Kodak n° 12 gélatine libre. Ce filtre jaune reste en place même pour le travail en lumière blanche.

RÉSULTATS

A. ACIDOPHILES ET BASOPHILES. — Les deux photographies que nous présentons ici rendent compte du fait général que nous mentionnons dans notre introduction.

Il s'agit d'un fragment de voile âgé de trois jours, récolté suivant la méthode de Hauduroy et ayant subi les deux colorations superposées décrites plus haut.

La photo n° 1 est prise en lumière bleue et reproduit les bacilles fluorescents sous l'aspect d'un véritable tapis. On peut remarquer des corps bacillaires isolés détachés du voile.

L'auramine étant un colorant basique, ces bacilles sont basophiles (β), classiques, colorables par le Ziehl Neelsen.

La photo n° 2 reproduit le même champ, mais il est pris en lumière blanche. Seuls les bacilles colorés par le bleu coton sont visibles. Ce sont les acidophiles (α). On remarquera qu'ils sont beaucoup moins nombreux que les basophiles.

Tel est le tableau général.

Malheureusement les émulsions photographiques ne sont pas suffisamment sensibles pour être impressionnées par une autre catégorie de bacilles qui, eux, retiennent à la fois et l'auramine et le bleu coton. Ces bacilles renferment conjointement une fraction basophile et une fraction acidophile ($\alpha\beta$). Néanmoins, l'œil humain les discerne parfaitement malgré leur faible fluorescence et leur teinte bleu pâle en lumière blanche. Nous avons pu en noter un nombre appréciable au cours de nos multiples observations. Il semble qu'ils soient environ cinq fois moins nombreux que les acidophiles stricts.

En résumé, la notion d'acidophilie-basophilie est représentée par trois catégories de bacilles :

- 1° Les basophiles stricts (β),
- 2° Les acidophiles stricts (α),
- 3° Les bacilles mixtes ($\alpha\beta$).

B. ACIDO-ALCOOLO-RÉSISTANCE. — L'acido-alcoolo-résistance des Mycobactéries fut découverte en 1882 par Ehrlich [1]. Depuis lors, de très nombreuses recherches ont été faites sur cette propriété. Aujourd'hui et depuis longtemps, il est admis que l'acido-alcoolo-

résistance n'est pas constante et qu'un même bacille n'est pas AAR à tous les stades de son évolution [4, 6, 7, 8].

Ces études n'ont évidemment porté que sur les seuls bacilles basophiles.

Nous avons pu constater que chez les acidophiles il existe aussi des AAR + et des AAR-.

Cette notion d'acido-alcoolo-résistance et de non acido-alcoolo-

TABLEAU I.

CATÉGORIES de BK α = acidophile β = basophile AAR = alcoolo-acido-résistant		Colorations superposées			
		décolorées		non décolorées	
		AAR+		AAR-	
		Aur. β	Bl. C. α	Aur. β	Bl. C. α
	%				
α + AAR+	1		+		+
α + AAR-	0,2				+
β + AAR+	70	+		+	
β + AAR-	25			+	
α + β + α AAR+ β AAR+	0,2	+	+	+	+
α + β + α AAR+ β AAR-	0,2		+	+	+
α + β + α AAR- β AAR+	0,2	+		+	+
α + β + α AAR- β AAR-	0			+	+

Aur. = Auramine. Bl. C. = Bleu coton.

résistance vient se superposer à la notion acidophilie-basophilie. Ce qui complique singulièrement le problème.

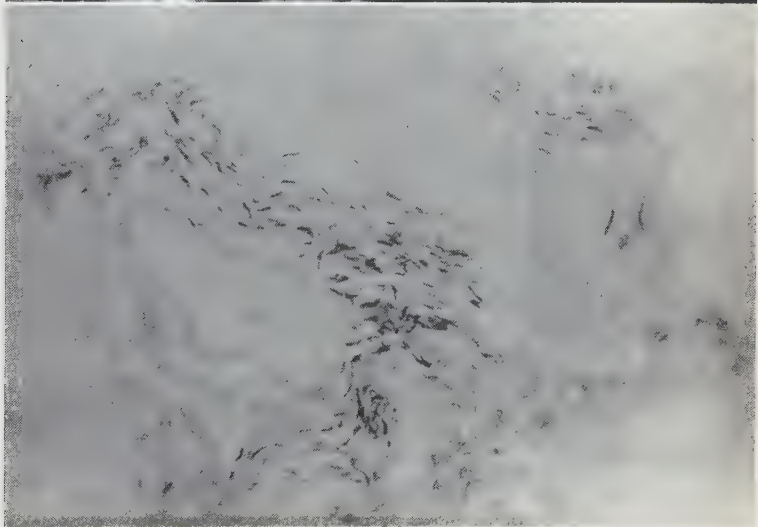
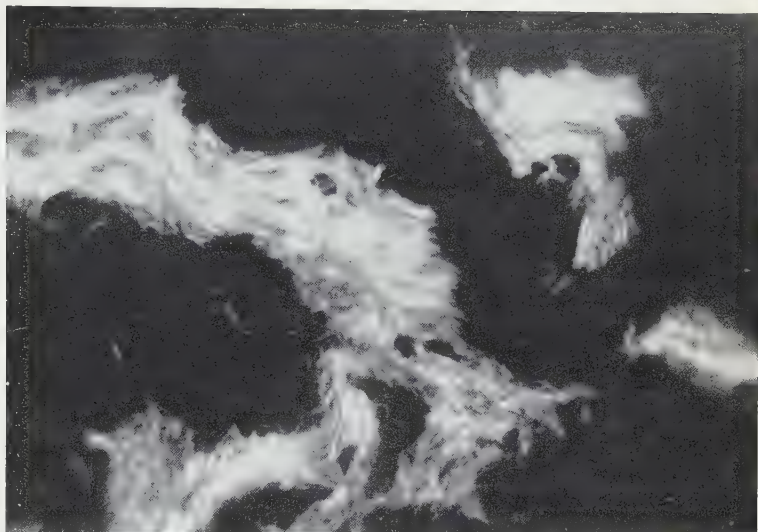
Si l'on fait un étalement de culture pure en milieu de Dubos à une dilution telle que l'éparpillement des germes puisse permettre l'observation et le repérage des corps bacillaires isolés les uns des autres ; si l'on applique successivement un colorant acide, puis un colorant basique ; et si l'on fait des repérages sur un très grand nombre de champs, entre les colorations avant déco-

LÉGENDE DE LA PLANCHE

H37Rv. Fragment de voile âgé de 3 jours.

Fig. 1. — En haut, vu en fluorescence : bacilles basophiles.

Fig. 2. — En bas, vu en lumière blanche : bacilles acidophiles.



loration et après décoloration de chacune des colorations, les observations notées et dessinées sont très diverses et apparemment discordantes, décevantes même.

Ces difficultés nous ont amené à poser le postulat résumé dans le tableau I.

Il nous a permis d'établir que théoriquement il pouvait exister 8 catégories de bacilles.

Dans la partie droite du tableau, nous avons inscrit les tests de coloration à appliquer.

Grâce à la multiplicité de nos expériences qui se sont échelonnées sur près de deux ans, nous avons pu constater que toutes ces catégories de bacilles existent dans la réalité, sauf la dernière $\alpha\beta$ (α AAR— β AAR—) que nous n'avons jamais pu observer.

Les chiffres de pourcentages que nous avons portés sont purement estimatifs.

Tels sont les faits d'observation.

INTERPRÉTATION

Il semble que l'on puisse envisager deux formules d'interprétation de conceptions différentes.

PREMIÈRE CONCEPTION.

La fixation biologique (coagulation des albumines), en tuant instantanément les cellules, permet l'observation d'un « moment », c'est-à-dire l'état figé d'un être vivant à un instant précis de son évolution.

Lorsque l'on fixe un étalement sur lame d'une culture pure, tous les corps bacillaires étalés sont figés dans l'état où chacun se trouve à cet instant précis. Naturellement cet état n'est pas le même de l'un à l'autre et il s'ensuit que tous ces bacilles ne présentent pas les mêmes propriétés tinctoriales et ne se colorent pas de la même façon.

Si l'on admet que chez la cellule vivante cet état évolue progressivement, nous abandonnerons le terme de « catégories de bacilles », qui est statique, et adopterons celui de « stades » qui est dynamique.

Cela nous conduit à l'interprétation évolutive schématisée par le tableau II, dans lequel nous avons essayé de situer chronologiquement les différents stades observés au cours de notre étude. Cet ordre chronologique pourrait être quelque peu différent, le tableau proposé visant simplement à montrer que le bacille, au

cours de son cycle évolutif, qui dure de dix-huit à vingt heures, passe par un état fugace caractérisé par son acidophilie.

Quant à la signification biologique de ce passage, elle demeure complètement obscure dans l'éventualité d'une telle interprétation.

TABLEAU II. — Première hypothèse.

Stades d'évolution du bacille tuberculeux		
	A %	B durée
bacille adulte		
β AAR ⁻	25	4 ^h 30'
α AAR ⁻	0,2	2'
α AAR ⁺	1	11'
{ α AAR ⁺ β AAR ⁻	0,2	2'
{ α AAR ⁺ β AAR ⁺	0,2	2'
{ α AAR ⁻ β AAR ⁺	0,2	2'
β AAR ⁺	70	12 ^h 6'
bacilles très jeunes		

Colonne A = Pourcentage approximatif, dans une population considérée, des bacilles présentant les mêmes propriétés tinctoriales, à un instant déterminé.
Colonne B = Estimation de la durée de chaque stade en raison des chiffres énoncés dans la colonne A, le temps d'une division à l'autre étant évalué à dix-huit heures.

DEUXIÈME CONCEPTION.

Si nous renonçons à inclure les bacilles acidophiles dans le cycle évolutif, il nous faudrait envisager une autre hypothèse et parler de différenciation cellulaire.

Cette nouvelle manière de voir donnerait toute sa valeur au mode de multiplication par bourgeonnement, mécanisme qui paraît occasionnel, mais qui a été observé et photographié par quelques auteurs, tels que Bretey et Browaeys [8], en France, Uyeda [9], au Japon.

Sans pouvoir ni vouloir établir une filiation obligatoire entre bourgeons et bacilles acidophiles, il nous semble logique d'admettre que, la multiplication des Mycobactéries ne s'effectuant pas par le seul mécanisme de la scissiparité, un petit

nombre de cellules, dans un *ensemble végétatif*, évolue différemment et qu'en définitive ce petit nombre acquiert des propriétés spécifiques. La vocation de ces cellules, leur mission, sera différente de celle des autres cellules. Elles pourraient être, dans cet *ensemble végétatif*, le germe, toutes les autres cellules, c'est-à-dire les basophiles, représentant le soma.

Cette conception nous entraîne assez loin, car dans de telles conditions il n'est plus possible d'accorder au seul bacille, au corps bacillaire unique, la qualité d'individu. Il ne pourrait être qu'une partie d'individu, une fraction de ce que nous avons appelé « un ensemble végétatif » qui, lui, serait l'individu, composé d'un soma destiné à mourir, à disparaître, et d'un germe qui perpétuera l'espèce.

Cette manière de voir n'est pas en désaccord avec l'opinion de Uyeda [9], qui considère les bacilles AAR comme des formes dégénérées ou mortes, ni avec celle de Canetti [10], qui écrit : « ... Il faut donc prêter la plus grande attention aux phénomènes de mort et de destruction bacillaire s'opérant dans l'intimité des tissus tuberculeux. Assurément ils ne sauraient à eux seuls constituer tout le processus tuberculeux, puisqu'ils doivent être précédés d'une période d'intense pullulement bacillaire, si la masse ultérieure des déchets doit atteindre un taux pathogène. Et de même doit-on, après ce phénomène de la destruction bacillaire, considérer celui de *la survie de certaines rares unités*, nécessaire pour que le bacille puisse coloniser à distance et recommencer son cycle de pullulement et de destruction. »

Le terme unité est pris, ici, au sens de cellule bacillaire et l'auteur envisage le problème tel qu'il se présente chez l'hôte contaminé, milieu de multiplication naturel. Mais pourquoi « certaines rares unités » bénéficieraient-elles d'une survie, si elles n'étaient morphologiquement différentes de la majorité des cellules bacillaires qui, elles, meurent et se désagrègent ?

Nous préciserons, en terminant, que nous ne donnons pas à la dénomination « ensemble végétatif » le même sens qu'à « colonie ». Le mot colonie désigne une figure plus ou moins macroscopique constituée d'un groupement d'ensembles végétatifs qui, eux, sont microscopiques et auxquels il conviendrait, le cas échéant, de donner un nom plus concret, plus défini, exprimant qu'il s'agit bien d'une *unité vitale* qui naît, grandit, se reproduit et meurt, conformément à la loi qui régit tout être vivant.

RÉSUMÉ.

Classiquement, le bacille de la tuberculose est un germe basophile acido-alcool-résistant (AAR). Mais si l'on applique correctement un colorant acide à un étalement de culture pure, on

constate qu'il existe un petit nombre de germes (1 p. 100 environ) qui ne se colorent que par les colorants acides. Nous les avons dénommés « acidophiles », par opposition aux « basophiles ».

Leur signification biologique pourrait être recherchée en formulant deux hypothèses, l'une tendant à admettre que tout bacille, au cours de son évolution, passe par un stade fugace d'acidophilie ; l'autre, de conception très différente, veut envisager la possibilité d'une différenciation cellulaire et fait entrevoir les conséquences qui en résulteraient.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE MECHANISM OF TUBERCLE BACILLUS MULTIPLICATION. ACIDOPHILIC BACILLI.

It is classical to say that t. b. is an acido-alcohol-fast basophilic germ. But, if a pure culture is treated by an acid stain, a few germs can be observed (about 1 p. 100) which are coloured only by acid stains. The author calls them « acidophilic » in contradistinction with the « basophilic » germs.

Two hypothesis may be put forward to explain their biological significance :

1. Every bacillus in the course of its evolution goes through a transitory stage of acidophily.

2. The second hypothesis implies a very different conception : a cellular differentiation might exist, the possible consequences of which are discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EHRLICH. *Deut. med. Wschr.*, 1882, **8**, 451.
- [2] HALLBERG. *Rev. Tub.*, 1946, **40**, 837.
- [3] HALLBERG. *Act. Med. Scand.*, 1946, **126**, 1.
- [4] HAUDUROY (P.). *Bacilles tuberculeux et paratuberculeux*. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1950.
- [5] DEGOMMIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 723.
- [6] LAPORTE (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 167.
- [7] NÈGRE (L.), BOQUET (A.) et VALTIS (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1930, **44**, 247.
- [8] BRETEY (J.) et BROWAEYS (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1945, **71**, 331.
- [9] UYEDA. *Rev. Tub.*, 1955, **49**, 984.
- [10] CANETTI (G.). *Rev. Tub.*, 1946, **40**, 26.
- [11] KUDDOH. *Act. Tub. Scand.*, 1956, **32**, 74.

ANTIGÈNE HERPÉTIQUE FIXANT LE COMPLÉMENT

par F. ARTZET (*) (**).

(*Institutionen för Virusforskning* [Professeur S. GARD],
Karolinska Institutet
et Statens bakteriologiska Laboratorium [Professeur G. OLIN])

Depuis les premiers essais de Todorovitch [18] avec pour antigènes des liquides de vésicule herpétique, et les « coctoantigènes » de Kraus et Takaki [11], la préparation d'antigènes pour fixation du complément a donné lieu à de nombreuses publications. Mais quel que soit le matériel utilisé à l'origine (coussinet plantaire de cobayes [3], cerveaux de lapin [15], membranes chorioallantoïques d'œufs embryonnés [10], liquides extra-embryonnaires [7, 9, 16]). le titre des antigènes est souvent faible. Celui des liquides de cultures de tissus qui pouvaient représenter le substrat de choix pour l'obtention d'un tel matériel en quantités importantes, reste plus faible encore [1, 19].

Aussi nous a-t-il semblé nécessaire, avant de poursuivre des études de purification et de constitution de l'antigène qui feront l'objet de publications ultérieures, d'essayer d'obtenir en culture de tissus une activité antigénique plus élevée. Etant donné les difficultés rencontrées (inactivation du matériel actif, apparition de pouvoir anticomplémentaire, etc.) pour la concentration par différents procédés physiques, il semblait préférable de tenter de concentrer l'antigène à l'origine dès sa formation [8]. Ce sont les résultats de quelques-unes de ces expériences que nous rapportons ici.

MATÉRIEL ET MÉTHODE.

CELLULES. — Les cellules rénales de lapin étant parmi les plus sensibles au virus herpétique [2] et d'obtention et d'emploi faciles, ce sont elles que nous avons choisies pour cette étude.

Elles sont obtenues par trypsination à froid [4] et mises en

(*) Boursière de l'Institut suédois pour l'année 1958-1959. Adresse actuelle : Institut Pasteur, Service des Virus.

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juin 1960.

culture à raison de 250 000 cellules/ml, en boîtes de Roux de 1 l, dans les milieux suivants :

a) A l'origine, milieu à l'hydrolysate de lactalbumine légèrement acide (pH 6,8 environ), additionné d'antibiotiques et de sérum de cheval (7 p. 100) et de lapin (5 p. 100).

b) Après quatre à six jours, le milieu est changé au profit d'un milieu toujours à l'hydrolysate de lactalbumine, mais cette fois de réaction voisine de la neutralité, et ne contenant que du sérum de cheval.

c) A l'inoculation, ce milieu est enfin remplacé par du milieu sans sérum.

VIRUS. — Il s'agit de la souche 54-33, isolée au Service des Virus de l'Institut Pasteur il y a quelques années, et conservée pour le temps de l'expérience à + 4° en présence soit du culot cellulaire, soit de lait écrémé [13].

INOCULATION. — Elle est pratiquée sur boîtes de Roux de 1 l, présentant un tapis continu.

Le milieu de culture est rejeté, remplacé par 100 ml de milieu sans sérum, et l'inoculum introduit ; pour assurer l'infection de chaque cellule, il est nécessaire d'introduire une dizaine de particules infectieuses par cellule, donc de calculer la dilution de l'inoculum en fonction du titre de virus employé.

RÉCOLTE DE L'ANTIGÈNE. — Avec la souche que nous avons utilisée, la dégénérescence des cellules a lieu, dans les conditions d'inoculation indiquées, entre la vingt-quatrième et la quarante-huitième heure, et on interrompt l'évolution de cette dégénérescence au moment où les cellules les plus superficielles du tapis cellulaire sont toutes atteintes et commencent à se détacher du verre, tandis que la trame profonde adhère encore.

A ce moment, on procède comme suit :

a) Le surnageant S est recueilli, centrifugé, s'il contient des cellules.

b) La couche cellulaire est lavée deux fois au PBS [6] sans calcium ni magnésium, puis recouverte (10 ml pour une boîte de Roux) d'une solution à 0,02 p. 100 dans du PBS de versène (acide éthylène-diamine-tétra-acétique), qu'on laisse au contact quinze minutes à 37°. A ce moment, après agitation, les cellules se détachent par nappes. On élimine le versène par une centrifugation à faible vitesse, après quoi l'on récupère le culot cellulaire dans du tampon au véronal utilisé pour les réactions de fixation de complément [14] : le volume est choisi en fonction de la concen-

tration souhaitée (dix, vingt, cinquante ou cent fois), calculée par rapport au volume initial de milieu introduit.

Cette suspension cellulaire est congelée-décongelée six fois en couche mince, puis centrifugée à faible vitesse pour éliminer les débris cellulaires ; le surnageant est considéré comme l'antigène C.

On prépare, dans les mêmes conditions, à partir de cellules de rein de lapin normales non inoculées, un extrait, qui sert de témoin normal.

FIXATION DU COMPLÉMENT. — *Diluant.* — C'est le tampon au véronal avec calcium et magnésium de Mayer et coll. [14].

Sérums. — Les sérums utilisés sont des sérums de lapins immunisés dans les conditions suivantes : des lapins, dont le sérum est dépourvu de pouvoir anticomplémentaire, reçoivent cinq injections intrapéritonéales, à raison de deux par semaine, de 1 ml d'une suspension de cerveau de lapin infecté, diluée à 10^{-1} . Dix jours après la dernière injection, soit entre la quatrième et la cinquième semaine après le début de l'immunisation, les lapins sont saignés à la veine pour contrôle de leur taux d'anticorps, puis au cœur, suivant le résultat de la fixation de complément.

Les sérums sont tous inactivés, après dilution au 1/10, par chauffage vingt minutes au bain-marie à 60° et utilisés dans la réaction, dilués du 1/10 au 1/160.

Antigènes. — Prélevés comme indiqué ci-dessus.

Complément. — On utilise du sérum de cobaye conservé congelé à -30° , et dilué de manière à contenir 1,5 unité dans 0,1 ml.

Système hémolytique. — Il s'agit d'hématies de mouton à 2 p. 100, sensibilisées avec du sérum hémolytique de lapin (6 unités dans 0,1 ml).

Pratique de la réaction. — Les réactifs, distribués dans l'ordre et les volumes suivants :

sérum, 0,1 ml,
antigène, 0,1 ml,
complément, 0,1 ml,

sont laissés dix-huit heures à $+4^{\circ}$, après quoi l'on ajoute 0,2 ml d'hématies sensibilisées, et la lecture a lieu après incubation quinze minutes à 37° .

RÉSULTATS.

Evolution de l'antigène dans le temps. — On a groupé dans le tableau I les résultats de la fixation du complément correspondant à l'une des expériences exécutées avec le matériel obtenu selon le processus décrit plus haut et concentré vingt fois.

D'après ce tableau, on peut aisément constater le comportement du matériel antigénique aux premiers jours de l'infection : vingt-quatre heures après l'inoculation, on n'en retrouve qu'une quantité infime dans le surnageant, alors qu'on peut l'extraire du

TABLEAU I. — Evolution de l'antigène dans le temps.

Antigènes	Dilutions du Sérum					Témoins antigènes.
	10	20	40	80	160	
24 h	S 1/1	4	4	4	0	0
	1/2	1	0	0	0	0
	C 1/1	4	4	4	4	2
	1/2	4	4	4	4	1
	1/4	4	4	4	4	tr.
	1/8	4	4	3	0	0
	1/6	4	1	0	0	0
48 h	S 1/1	4	4	4	4	tr.
	1/2	4	4	4	4	0
	1/4	3	4	3	tr.	0
	1/8	2	1	0	0	0
	C 1/1	0	0	0	0	0
Normal 1/1	0	0	0	0	0	0
Témoin sérum	0	0	0	0	0	0

Les témoins antigènes et sérum correspondent à 0,1 ml de ces éléments + 0,1 ml de diluant + 0,1 ml de complément (permettent de s'assurer de toute réaction aspécifique due par exemple à un pouvoir anticomplémentaire). S et C : voir texte, § Récolte de l'antigène. Normal : Antigène témoin normal : voir texte. Expression de l'hémolyse : 0, hémolyse totale ; 4, absence totale d'hémolyse ; 1-2-3, degrés intermédiaires ; tr., traces d'hématies.

matériel cellulaire ; au stade suivant, c'est l'inverse, l'antigène est passé des cellules dans le milieu, où on le retrouve au même titre que dans les cellules au stade précédent.

Concentration du matériel antigénique. — D'après cette constatation, on peut concevoir qu'il soit possible de concentrer le matériel antigénique à partir de la phase cellulaire. Le tableau II rend compte de quelques-uns de ces essais, avec des prélèvements pratiqués autour de la vingt-quatrième heure.

On voit que, si les titres restent encore faibles, néanmoins la concentration est effective.

Signalons que l'on n'a pas observé de réaction de fixation aspé-

TABLEAU II. — Concentration de l'antigène.

Antigènes	Dilutions du Sérum					Témoins antigènes.
	10	20	40	80	160	
S 1/1	4	4	3	tr.	0	0
1/2	3	tr.	0	0	0	0
C 5 1/1	4	4	4	4	2	0
1/2	4	4	1	0	0	0
1/4	3	tr.	0	0	0	0
C 10 1/1	4	4	4	4	2	0
1/2	4	4	4	3	tr.	0
1/4	4	4	3	0	0	0
1/8	4	1	0	0	0	0
C 20 1/1	4	4	4	4	2	0
1/2	4	4	4	4	3	0
1/4	4	4	4	2	0	0
1/8	4	4	1	0	0	0
C 50 1/1	4	4	4	4	4	0
1/2	4	4	4	4	3	0
1/4	4	4	4	3	3	C
1/8	4	4	3	1	tr.	0
C 100 1/2	4	4	4	4	4	0
1/4	4	4	4	4	4	0
1/8	4	4	4	4	4	0
1/16	4	4	4	1	0	0
1/32	4	1	tr.	0	0	0

Expression de l'hémolyse, voir légende du tableau I. S, surnageant de la culture de tissus. C 5, 10, 20, 50 ou 100 : antigène du culot cellulaire concentré 5, 10, 20, 50 ou 100 fois. Témoin antigène : 0,1 ml d'antigène ; 0,1 ml de diluant ; 0,1 ml de complément.

cifique entre les sérums utilisés et les extraits cellulaires préparés à partir de cellules de rein de lapin normales non infectées, qui servent de témoins aux antigènes des culots cellulaires, à condition toutefois que la concentration soit inférieure à cent fois. Pour cette concentration, il y a une faible réaction (fixation avec l'extrait normal pur et les deux premières dilutions du sérum), qui ne semble pas pourtant fausser considérablement les résultats.

DISCUSSION.

Les cultures de tissus sont mauvais producteurs d'antigène fixant le complément ; aussi avons-nous cherché à concentrer le matériel antigénique, tout en étudiant sa formation dans le temps.

On peut ainsi observer le passage progressif de l'antigène de la phase cellulaire au milieu. La technique des congélations-décongélations permet de provoquer artificiellement ce passage dans le volume et le diluant choisis ; l'éclatement brutal des cellules entraîne la libération de l'antigène qu'elles renferment. C'est probablement par un processus de même type que, dans certains cas, le titre des liquides de culture augmente par séjour prolongé à l'étuve (cinq à sept jours après la dégénérescence du tapis cellulaire) de cultures infectées d'herpès ; l'autolyse progressive et spontanée des cellules atteintes remplace alors les congélations-décongélations. C'est sans doute pour la même raison que les titres des suspensions de membranes chorioallantoïques sont supérieurs à ceux des liquides extra-embryonnaires [17], que les congélations-décongélations successives des broyats de ces membranes ont une action favorisante sur leur titre, enfin que les liquides extra-embryonnaires d'œufs morts sont meilleurs antigènes que ceux des sacrifiés [16]. Il est en outre intéressant de rapprocher les résultats obtenus ici des informations recueillies par l'application à l'étude de l'herpès de la technique des anticorps fluorescents [12].

Des expériences préliminaires d'ultracentrifugation nous permettent de penser que l'antigène recueilli au cours de son développement intracellulaire est l'antigène « soluble » ; d'autre part, les titres infectieux des prélèvements dans le temps indiquent que sa production accompagne (ou peut-être même précède) celle du virus infectieux dans des conditions qu'il nous reste à préciser.

Enfin il semble que l'on puisse avoir en cette technique d'extraction une méthode assez générale pour la préparation d'antigènes d'autres virus, pour lesquels les difficultés d'obtention sont les mêmes que dans le cas de l'herpès (titres faibles, pouvoir anti-complémentaire des liquides surnageants) : virus poliomyélitique. Cocksackie B, ECHO, rougeole, par exemple.

RÉSUMÉ.

Description d'un procédé d'étude de l'évolution de l'antigène herpétique (qui peut permettre sa concentration), en culture de cellules de rein de lapin : l'on peut ainsi suivre son passage de la phase cellulaire à la phase liquide. Application possible de la méthode à d'autres virus.

SUMMARY

STUDIES ON COMPLEMENT-FIXING HERPETIC ANTIGEN.

The author describes a technique allowing to follow the evolution of herpetic antigen in rabbit kidney cell culture, and the migration of this antigen from the cells into the liquid phase of the culture.

This technique also allows to concentrate the antigen. It might be applied to the study of other viruses.

★★

Nous remercions M. le professeur Sven Gard de l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire et de l'attention qu'il a bien voulu accorder à notre travail ; M^{me} le Docent Astrid Fagraeus-Wallbom de ses conseils et de son appui constants ; les assistants et techniciennes des « Virusinstitutionen » et « Statens bakteriologiska Laboratorium » qui tous, d'une manière ou d'une autre, nous ont aidée au cours de ce séjour.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BALDUCCI (D.), TYRREL (D. A. J.) et STUART-HARRIS (C. H.). *Arch. ges. Virusforsch.*, 1956, **7**, 28-35.
- [2] BARSKI (G.), LAMY (M.) et LÉPINE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 415-427.
- [3] BEDSON (S. P.) et BLAND (J. O. W.). *Brit. J. exp. Path.*, 1929, **10**, 393-404.
- [4] DANIEL (Ph.) et DEPOUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 703-704.
- [5] DUDGEON (J. A.). *J. clin. Path.*, 1950, **3**, 239-247.
- [6] DULBECCO (R.) et VOGT (M.). *J. exp. Med.*, 1954, **99**, 162-182.
- [7] GAJDUSEK (D. C.), ROBBINS (M. L.) et ROBBINS (F. C.). *J. Amer. med. Assoc.*, 1952, **149**, 235-240.
- [8] GARD (S.). (Résultats non publiés.)
- [9] HALONEN (P.). *Investigations on the virus of herpes simplex*, Thèse Helsinki, 1955.
- [10] HAYWARD (M. E.). *Brit. J. exp. Path.*, 1949, **30**, 520-529.
- [11] KRAUS (R.) et TAKAKI (J.). *Wien. klin. Wschr*, 1926, **39**, 624.
- [12] LEBRUN (J.). *Virology*, 1956, **2**, 496-510.
- [13] LÉPINE (P.), ARTZET (F.) et CEOLIN (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 750-753.
- [14] MAYER (M. M.), OSLER (A. G.), BIER (O. G.) et HEIDELBERGER (M.). *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 535-548.
- [15] SCHULTZ (E. W.) et HOYT (J.). *J. Immunol.*, 1928, **15**, 411.
- [16] SOHIER (R.), PEILLARD (M. M.) et CHARDONNET (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 489-504.
- [17] SOSA-MARTINEZ (J.). et LENNETTE (E. H.). *J. Bact.*, 1955, **70**, 205-215.
- [18] TODOROVITCH (K.). *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92**, 1017-1018.
- [19] WHITNEY (E.). *Ann. Rep. Div. Lab. Res.*, 1956, 41-42

PRÉPARATION D'ANTIGÈNES POUR LA DÉVIATION DU COMPLÉMENT DANS LE DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DES AFFECTIONS A VIRUS COXSACKIE, GROUPE B.

par L. ROBBA (*) et M^{me} J. VIRAT (**).

(*Institut Pasteur, Paris. Service des Virus [D^r P. LÉPINE]*)

L'importance du diagnostic de laboratoire dans les affections à virus Coxsackie n'a cessé de croître depuis la découverte de Dalldorf et Sickles en 1948 [1]. Actuellement ces virus ont pu être classés en deux groupes distincts, A et B [2], auxquels appartiennent, selon les classifications les plus récentes [3, 4] : 24 types sérologiques pour le groupe A et 6 types sérologiques pour le groupe B.

La multiplicité des affections ou des syndromes que l'on peut associer à ces virus, qui font partie de la grande famille des entérovirus, leurs rapports avec les virus poliomyélitiques et ECHO, leur isolement contemporain chez un même malade, mettent au premier plan le diagnostic de laboratoire pour éclairer un domaine discuté et encore complexe de la virologie moderne.

L'isolement des virus du groupe Coxsackie, à partir des prélèvements tels que selles ou écouvillonnages rectaux, plus rarement prélèvements pharyngés, sang ou liquide céphalo-rachidien, est possible, comme on le sait déjà, grâce aux manifestations spécifiques que produisent ces virus (groupes A et B) chez le souriceau nouveau-né ; l'isolement sur cultures de tissus (rein de singe, amnios humain, cellules de souche HeLa et KB) a montré également le pouvoir cytopathogène des virus Coxsackie, semblable à celui des autres entérovirus dans ses manifestations morphologiques (groupe B, groupe A : types 9 et 23). Dans ce dernier cas, l'isolement pourra facilement être suivi de typage [5].

Depuis 1949, Casals [6] et ses collaborateurs ont appliqué la réaction de déviation du complément à l'identification des virus du groupe Coxsackie, et de nombreux auteurs ont publié différentes

(*) Assistant volontaire de la Clinique Médicale de l'Université de Modène (Italie).

(**) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 juillet 1960.

méthodes de préparation des antigènes. Melnick et ses collaborateurs [7] ont décrit un antigène préparé à partir de carcasses de souriceaux nouveau-nés, purifié par le sulfate de protamine et concentré par ultra-centrifugation. Howitt et Benefield [8] ont utilisé des suspensions non fractionnées de muscles de souriceaux (seul le muscle étant prélevé), congelées et décongelées plusieurs fois et filtrées sur filtre Seitz. Manire, Sulkin et Farmer [9] utilisent soit des suspensions brutes de souriceaux infectés, soit le surnageant après centrifugation à 2 500 t/min pendant 30 min. Dodd [10] prépare un antigène purifié en précipitant les protéines par une solution à 0,5 p. 100 d'urate de potassium, puis une centrifugation à 18 000 t/min pendant 30 min. Casals [11], depuis 1949, emploie la méthode d'extraction à l'acétone-éther, qu'il avait appliquée auparavant aux virus neurotropes en général [12] et définit ainsi les propriétés d'un antigène acceptable :

- a) Etre strictement spécifique.
- b) Avoir un titre élevé, pour mettre en évidence la plus petite quantité d'anticorps spécifiques.
- c) Etre d'une préparation suffisamment simple pour que celle-ci puisse être exécutée dans un laboratoire doté d'un équipement ordinaire.

Après avoir essayé la plupart des méthodes, Delpy [13] a mis au point la préparation d'un antigène purifié (protamine-éther) qui a donné des résultats très satisfaisants pour les réactions de déviation du complément sur plaques [14], dérivées de la méthode de Fulton et Dumbell [15].

La méthode de Delpy est celle que nous continuons à utiliser pour la préparation des antigènes du groupe Coxsackie A.

En ce qui concerne la préparation des antigènes spécifiques du groupe Coxsackie B, Humber [16] a adopté des antigènes provenant de souriceaux infectés et de cultures tissulaires, mais ne donne pas de références sur les techniques employées. Enfin, Castelli et ses collaborateurs [17] préparent des antigènes pour les groupes A et B, par des techniques courantes légèrement modifiées et les appliquent à la réaction de déviation du complément.

Après les études expérimentales de Melnick et coll. [18] qui ont suivi l'apparition des anticorps fixant le complément chez le chimpanzé, cette réaction est appliquée au diagnostic des virus Coxsackie, du groupe A ; au contraire, pour le groupe B des difficultés ont été fréquemment rencontrées dans la préparation des antigènes : titre insuffisant, pouvoir anticomplémentaire marqué.

Les anticorps fixant le complément dans les affections à virus Coxsackie seraient sans relation avec ceux de la poliomyélite [19, 20], bien que l'association de deux virus soit fréquemment ren-

contrée et que la présence de l'un n'exclue pas la possibilité d'une affection concomitante due à l'autre. Mais la question est actuellement controversée [32].

L'épreuve de séroneutralisation est préférée pour la confirmation de l'affection chez les malades et dans leur entourage (prélèvements de sang précoces et tardifs) [2, 21, 22, 23, 24, 25].

Cependant l'intérêt de la réaction de déviation du complément réside dans la mise en évidence d'anticorps apparaissant plus précocement que les anticorps neutralisants.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Pour la préparation des antigènes du groupe Coxsackie B, destinés à être employés dans une réaction de déviation du complément, nous nous sommes inspirés de la méthode employée par M^{lle} F. Artzet [26, 27] pour la préparation d'un antigène herpétique et d'un antigène poliomyélitique.

Dans une première expérience nous sommes partis d'une souche de virus Coxsackie groupe B, type 5, isolée dans le Service des Virus. Le virus destiné aux inoculations a été préparé sur cellules épithéliales de rein de singe (*Cynocephalus babuin*). Six antigènes ont été préparés : deux à partir de souriceaux nouveau-nés, quatre à partir de cultures cellulaires (rein de singe et cellules de souche KB [28]).

A. Les souriceaux, race Suisse, âgés de 24-48 heures, sont ceux d'un troisième passage, sacrifiés quatre jours après l'inoculation intracérébrale de 0,1 ml d'une suspension de cerveaux de souriceaux prélevés au deuxième passage. Les animaux ont tous présenté la symptomatologie typique de l'infection à virus Coxsackie B : tremblement, attitude spasmodique des membres, puis ataxie marquée ; enfin les paralysies se généralisent en entraînant rapidement la mort [29].

Les cerveaux ont été séparés des carcasses et traités par la méthode de Casals à l'acétone-éther ; l'antigène carcasses de souriceaux est préparé selon la méthode habituelle du Service des Virus (*antigènes I et II*).

B. Antigènes de cultures cellulaires : les boîtes de Roux contenant les cultures cellulaires (rein de singe et KB) reçoivent, préalablement à l'introduction du virus, un nouveau milieu, sans sérum pour les cellules de rein de singe, avec 2,5 p. 100 de sérum de veau pour les cellules KB. Ce virus est inoculé à raison de 10 ml pour 100 ml de milieu, volume calculé en fonction du titre de virus et de la richesse en cellules de la culture. Dès l'obtention d'un effet cytopathogène spécifique total, le liquide surnageant est prélevé, centrifugé à froid à raison de 2 500 t/min pendant 15 min, décanté et conservé à + 4° (*antigène III* préparé sur cellules de rein de singe ; *antigène V* des cultures de cellules KB).

Le culot de centrifugation est repris dans 5 ml de diluant tamponné stérile [30], ce qui correspond à une concentration égale à 20 par rapport au volume initial. Le tout est rapidement congelé et décongelé six fois, puis centrifugé à 2 500 t/min pendant 15 min. Le surnageant constitue l'*antigène (IV, cellules de rein de singe ; V, cellules KB)*.

RÉACTION.

Exécutée selon la méthode de Kolmer, elle ne diffère pas de la technique employée dans le laboratoire de sérologie du Service des Virus pour les examens de routine avec les principaux antigènes viraux. Parmi toutes les expériences que nous avons effectuées, nous en avons choisi deux pour les décrire en détail ici.

Dans la première expérience, nous avons utilisé :

1° Quatre sérums de malades chez lesquels avait été isolé un virus Coxsackie B, type 5. Ces sérums sont employés aux dilutions suivantes : 1/4, 1/8, 1/16.

2° Deux sérums d'animaux immunisés : Coxsackie B5 (lapin) et Coxsackie B4 (souris), aux dilutions suivantes : 1/8, 1/16, 1/32.

La dilution à 1/4 a été éliminée pour les sérums d'animaux, ceux-ci risquant d'être anticomplémentaires à cette dilution malgré un chauffage de 20 min à 60°. Les sérums humains sont inactivés 30 min au bain-marie à 56°.

A 0,1 ml de chaque dilution de sérum, sont ajoutés :

a) 0,1 ml de chacune des dilutions suivantes des antigènes dont la préparation a été décrite ci-dessus :

Ant. I et II (cerveaux et carcasses de souris) : 1/2, 1/4.

Ant. III et V (surnageants de cultures cellulaires) : pur et 1/2.

Ant. IV et VI (culots de cultures cellulaires) : 1/2 et 1/4.

b) Le complément : 0,2 ml d'une dilution à 2 unités.

c) Système hémolytique : 0,1 ml d'hématies de mouton à 2 p. 100 sensibilisées par 0,1 ml de sérum hémolytique (3 unités).

RÉSULTATS DE LA PREMIÈRE EXPÉRIENCE.

Ils sont inscrits dans le tableau I. Comme on peut le voir le sérum de souris B4 est entièrement négatif. Les sérums humains B5 montrent une absence totale d'hémolyse avec l'antigène VI et une hémolyse partielle avec l'antigène V, montrant par là les propriétés antigéniques faibles du surnageant des cultures de cellules KB (la récolte de l'antigène ayant, dans ce cas, été un peu tardive, après diffusion partielle du virus).

Le sérum de lapin permet les mêmes constatations ; mais nous devons remarquer en outre que ce sérum ayant été obtenu par des inoculations de virus cultivé sur cellules de rein de singe, les antigènes préparés à partir de ces mêmes cellules donnent des réactions non spécifiques (absence d'hémolyse avec les témoins).

Nous devons également signaler la présence d'une inhibition non spécifique avec les témoins cellules KB, mais cette inhibition est nettement moins importante que l'inhibition spécifique, ce qui permet d'interpréter la réaction. Nous verrons plus loin comment nous avons pu éliminer cet inconvénient.

Les témoins antigènes et les témoins sérums sont négatifs : absence de pouvoir anticomplémentaire des antigènes.

Un deuxième essai a été fait en modifiant légèrement la méthode de préparation des antigènes à partir des cultures de cellules KB, celles-ci nous ayant seules donné des résultats satisfaisants lors de la première expérience.

Nous avons préparé les antigènes à partir de 5 souches de virus Cox-sackie B. Le culot de centrifugation est repris dans un volume tel que

TABLEAU I.

	cerv. sour.	carc. sour.	surnag. R.S.	culot R.S.	surnag. KB	culot KB			
	ant.1	ant.2	ant.3	ant.4	ant.5	ant.6	tém. R.S.	tém. K.B.	diluant
Souris B 4	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8
Lapin B 5	< 8	< 8	(≥ 32)	(≥ 32)	≥ 32	≥ 32	(≥ 32)	8	< 8
Sér.hum. B 5 n° 1 précoce	(anticomplémentaire)								16
tardif	< 4	< 4	< 4	< 4	<u>16</u>	<u>16</u>	< 4	< 4	< 4
Sér.hum. B 5 n° 2 précoce	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	<u>4</u>	< 4	< 4	< 4
tardif	< 4	< 4	< 4	< 4	<u>4</u>	<u>8</u>	< 4	< 4	< 4
Diluant	0	0	0	0	0	0	0	0	0

la concentration finale de chaque antigène est égale à 50 par rapport au volume initial. Le tout est congelé et décongelé huit fois au lieu de six.

Dans cette deuxième série nous avons choisi quatre sérums de lapins immunisés vis-à-vis des virus Cocksackie B1, B3, B4 et B5 ; un sérum de lapin non immunisé, employé aux mêmes dilutions que dans la première expérience, soit 1/8, 1/16, 1/32.

Les antigènes sont les suivants :

Surnageants de cultures cellulaires (KB), purs et dilués à 1/2.

Culots de cultures cellulaires (KB), dilués à 1/4 et 1/8.

Ces antigènes ont été traités par de l'éther à volume égal, qu'on a laissé agir cinq minutes avant centrifugation à faible vitesse ; la phase aqueuse constitue l'antigène.

Les témoins de ces antigènes sont les liquides surnageants de cultures

cellulaires sans virus, et le culot de centrifugation de ces mêmes cultures, congelé et décongelé huit fois.

Complément et système hémolytique sont employés aux mêmes dilutions que précédemment.

RÉSULTATS DE LA DEUXIÈME EXPÉRIENCE.

Le tableau II montre l'absence d'hémolyse pour les sérums en présence de leurs antigènes homologues jusqu'à la dilution 1/16 et 1/32 avec l'antigène dilué 1/8.

Les sérums B4 et B5 fixent totalement le complément en présence de l'antigène B2 (dilution de sérum 1/8). Pas de réaction croisée pour les sérums B1 et B3.

Hémolyse totale dans le sérum de lapin non immunisé, en présence de tous les antigènes.

Les antigènes et les sérums sont dépourvus de pouvoir anti-complémentaire.

TABLEAU II.

	avant traitement par l'éther							après traitement par l'éther						
	B1	B2	B3	B4	B5	N.	D.	B1	B2	B3	B4	B5	N.	D.
Lap. B 1	16	<8	<8	<8	<8	<8	<8	16	<8	<8	<8	<8	<8	<8
Lap. B 3	16	16	16	8	8	8	<8	<8	<8	16	<8	<8	<8	<8
Lap. B 4	8	16	8	16	<8	8	<8	<8	8	<8	16	<8	<8	<8
Lap. B 5	8	16	8	8	16	8	<8	<8	8	<8	<8	32	<8	<8
Lap. Normal	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
Diluant	0	0	0	0	0	0	0	00	0	0	0	0	0	0

Dans nos premières expériences, nos résultats avaient été partiellement ininterprétables, certains sérums donnant une réaction non spécifique avec l'antigène témoin (culot cellulaire).

C'est pourquoi nous avons fait agir un volume égal d'éther susceptible d'éliminer les lipides de l'antigène (1).

DISCUSSION.

Nos premiers essais ont été volontairement limités aux sérums de lapins hyperimmunisés, mais nous nous proposons de reprendre ultérieurement les sérums humains avec lesquels nous pensons

(1) F. Artzet : En préparation.

pouvoir obtenir des résultats satisfaisants, malgré quelques réactions non spécifiques de type. Ces réactions croisées, également constatées avec certains sérums de lapin, nous ont amenés à considérer l'existence possible d'un antigène de groupe pouvant, comme dans les affections à adénovirus par exemple, faciliter le diagnostic de l'affection par la méthode de fixation du complément ; le type du virus en cause peut être déterminé ultérieurement par la méthode de séroneutralisation, si l'isolement du virus ne peut être fait.

Il restera à étudier les éventuelles relations croisées avec les virus du groupe Cocksackie A, les virus poliomyélitiques et les virus ECHO. En effet, une récente publication de Haloven et coll. [32] fait état de telles relations.

RÉSUMÉ.

Des antigènes fixant le complément ont été préparés à partir des 5 souches de virus Cocksackie, groupe B, cultivés sur cellules KB.

Les résultats obtenus incitent à continuer les recherches dans le domaine des réactions croisées, non seulement avec les virus Cocksackie, mais aussi avec les autres entérovirus.

SUMMARY

PREPARATION OF ANTIGENS FOR SEROLOGIC DIAGNOSTIC OF COXSACKIE B INFECTIONS BY MEANS OF COMPLEMENT FIXATION.

Complement fixing antigens were prepared from five strains of Cocksackie B virus cultivated on KB cells.

The findings suggest the possibility of cross-reactions between the Cocksackie viruses, and between the Cocksackie and other enteroviruses.

★★

L. Robba remercie M. le D^r Pierre Lépine de l'accueil qu'il lui a réservé dans ses laboratoires et des encouragements qu'il a bien voulu lui donner dans son travail. Il remercie également le D^r Jacques Maurin pour les conseils précieux qu'il a reçus de lui.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DALLDORF (G.) et SICKLES (G. M.). *Science*, 1948, **108**, 61.
- [2] DALLDORF (G.), MELNICK (J. L.) et CURNEN (E. C.) in HORSFALL et RIVERS. *Viral and rickettsial infections of man*, 3^e édit., J. B. Lippincott, Philadelphie, 1959.

- [3] HAMMON (W. McD.), JOHN (D. S.) et PAVIA (R. A.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1960, **103**, 1.
- [4] SICKLES (G. M.), MUTTERER (M.) et PLOGER (H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1959, **102**, 724.
- [5] MAURIN (J.). Conférence au Cours de Microbiologie 1959-1960, Institut Pasteur.
- [6] CASALS (J.), OLITSKI (P. K.) et MURPHY (L. C.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1949, **72**, 636.
- [7] MELNICK (J. L.). *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 342. — KRAFT (L. M.) et MELNICK (J. L.). *J. exp. Med.*, 1950, **92**, 483.
- [8] HOWITT (B. F.) et BENEFIELD (U. R.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1950, **73**, 90.
- [9] MANIRE (G. P.), SULKIN (S. E.) et FARMER (T. W.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1950, **73**, 341.
- [10] DODD (R. L.). *Annual report of the Division of Laboratories and Research*, New York State Dept. of Health, Albany, 1950.
- [11] CASALS (J.) et OLITSKI (P. K.). *Fed. Proc.*, 1950, **9**, 570.
- [12] CASALS (J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1949, **70**, 339.
- [13] DELPY (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 780.
- [14] LÉPINE (P.), SAUTTER (V.), DELPY (J.) et ARTZET (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 684.
- [15] FULTON (F.) et DUMBELL (K. R.). *J. gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 97.
- [16] HUMBER (K.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, **67**, 248.
- [17] CASTELLI (L.), BALDUCCI (D.) et MANCINI (G.). *R. C. Ist. sup. Sanità*, 1957, **20**, 109.
- [18] MELNICK (J. L.), KAPLAN (A. S.) et KRAFT (M.). *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 367.
- [19] CURNEN (E. C.) et MELNICK (J. L.). *Pediatrics*, 1951, **8**, 237.
- [20] SYVERTON (J. T.) et coll. *J. Amer. med. Assoc.*, 1957, **164**, 2015.
- [21] GIRARDI (A. J.), HUMMCLER (K.) et OLSHIN (I.). *J. Lab. clin. Med.*, 1957, **50**, 526.
- [22] SOLOVIEV (V. D.), GUTMAN (N. R.), MENTKEVICH (L. M.) et KROPOTOVA (N. I.). *Vopr. Virusol.*, 1959, **3**, 301.
- [23] WALTON (M.), MELNICK (J.) et MYERS (I. L.). *Publ. Hlth. Rep.*, 1953, **68**, 1167.
- [24] LÉPINE (P.) et SOHIER (R.). *Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus*, Masson édit., Paris, 1954.
- [25] RITA (G.) et RUSSI (M.). *Congrès de Virologie*, Milan, 1958.
- [26] ARTZET (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 777.
- [27] ARTZET (F.). [A paraître dans *Ann. Inst. Pasteur*.]
- [28] EAGLE (H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **84**, 362.
- [29] LÉPINE (P.). *Sem. Hôp. Paris*, 1953, **20**, 3533.
- [30] MAYER (M. M.), OSLER (A. G.), BIER (O. G.) et HEIDELBERGER (M.). *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 535.
- [31] MAURIN (J.), CARRÉ (M. C.) et VIRAT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 211.
- [32] HALOVEN (P.), ROSEN (L.) et HUEBNER (R. J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1959, **101-102**, 236.

COMPARAISON DE DEUX SOUCHES DE PESTE PORCINE AU MOYEN DE L'INTERFÉRENCE AVEC LE VIRUS GRIPPAL EN CULTURES CELLULAIRES

par M^{me} I. JANOWSKA (*) (**).

(Institut Pasteur, Service des Virus [D^r P. LÉPINE])

Les essais exécutés jusqu'ici pour déceler le virus de la peste porcine (p. p.) n'ayant pas mis en évidence de lésions des cellules en culture, nous avons entrepris des expériences basées sur le phénomène d'interférence avec un virus déjà adapté, produisant des lésions sur des cellules cultivées *in vitro*.

Antérieurement, en effet, des expériences pour déceler le virus p. p. par son action sur le virus de la maladie de Newcastle dans des cultures de tissus de porc ont déjà été réalisées [1]. Cette méthode permet de reconnaître et de titrer *in vitro* le virus de la peste porcine et ses anticorps. Elle est basée sur l'effet stimulant de ce virus sur celui de la maladie de Newcastle en culture des tissus testiculaires de porc.

MATÉRIEL.

1° CELLULES. — On prélève sur un porc adulte les reins et on les trypsinise suivant la technique de trypsination continue utilisée au Service des Virus et déjà décrite [2].

2° MILIEUX. — Pour obtenir la meilleure croissance des cellules on a employé plusieurs milieux constitués de la manière suivante :

a) Milieu à l'hydrolysate de caséine [3] dilué à volume égal avec de la solution de Hanks.

b) Selon la méthode de Galloway : 3 volumes de liquide de Hanks + 2 volumes de solution de Earle + 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine + 0,01 g d'extrait de levure.

(*) Docteur vétérinaire, Assistante au Laboratoire de Virologie, Institut Vétérinaire de Pulawy (Pologne).

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juillet 1960.

c) Milieu à l'hydrolysate de caséine, 3 volumes + hydrolysate de lactalbumine, 2 volumes.

On n'a pas observé dans les résultats de grandes différences entre ces trois compositions de milieu, cependant ceux obtenus avec le milieu de Galloway ont paru légèrement supérieurs.

3° VIRUS. — Pour les expériences nous avons utilisé les virus suivants :

a) Virus de la peste porcine, souche virulente (p. p. v.) : une rate entière de porc mort au troisième jour de la peste porcine, conservée congelée.

b) Virus de la peste porcine lapinisée (p. p. l.) souche lyophilisée (1).

c) Virus de la grippe (type A₂ souche L', cinquante-cinquième passage sur cellules de rein de veau).

MÉTHODES.

a) On observe sous le microscope l'effet cytopathogène caractéristique du virus grippal.

b) En outre, pour mieux mettre en évidence la présence du virus grippal dans les cultures de cellules, on utilise la méthode d'hémadsorption (fixation des hématies) de Vogel et Shelokov [4].

Chaque expérience a comporté les témoins suivants :

a) Cellules témoins non inoculées.

b) Cellules inoculées avec le virus de la grippe à la dilution 10⁻².

c) Cellules inoculées avec p. p. v. 10^{-1,5}.

d) Cellules inoculées avec p. p. l. 10^{-1,5}.

e) Contrôle du virus de la grippe par hémagglutination.

f) Contrôle du virus p. p. l. sur lapin.

Les expériences ont été conduites de la manière suivante :

1° En premier lieu, titrage du virus grippal sur cellules de rein de porc de première explantation. On a dilué le virus de 10⁻¹ jusqu'à 10⁻⁶, puis on a inoculé pour chaque dilution 5 tubes et 3 flacons de pharmacie de cellules de cinq jours. D'après les résultats de ce titrage, la dilution choisie pour les autres expériences a été de 10⁻².

(1) Les virus des pestes porcines nous ont été aimablement fournis par le professeur Goret de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, à qui nous adressons tous nos remerciements.

2° En ce qui concerne d'autre part les virus p. p., pour déterminer le moment le plus favorable on a fait parallèlement sur les mêmes cellules, d'une part l'inoculation des virus p. p. en même temps que l'ensemencement des cellules, d'autre part l'inoculation de ces virus au cinquième et au huitième jour de croissance cellulaire. Puis on a introduit le virus grippal pour étudier les phénomènes d'interférence. L'inoculation au cinquième jour a été fixée pour les autres expériences comme étant la plus favorable. Le phénomène d'hémadsorption et les lésions cellulaires ont été observées les deuxième, troisième et quatrième jours après l'ino-

TABLEAU I. — Interférence entre les virus p. p. v. et p. p. l.

date		dilutions p.p.v.-p.p.l.	tubes								
			1 ppv	2 ppl	3 ppv	4 ppl	5 ppv	6 ppl	7 ppv	8 ppl	9 ppv
28-3	inoc.	$10^{-1,5}$									
31-3	lésions hémadsorption		- -	- -	- -	- +	- -	- -	- -	- -	- -
28-3	inoc.	10^{-2}									
	lésions hémadsorption		- -	+ +	- -	- -	- -	- -	- -	++ +	- -
28-3	inoc.	10^{-3}									
31-3	lésions hémadsorption		+ +	+ +	- -	++ ++	++ +	- -	+ -	+++ +++	- -
28-3	inoc.	10^{-4}									
31-3	lésions hémadsorption		+++ +++	++++ +++	+ +++	+++ ++++	+ +++	++ +++	+ -	+ +++	++ +++
28-3	inoc.	10^{-5}									
31-3	lésions hémadsorption		++ +++	+++ +++	+++ ++++	+++ +++	+ ++	+++ +++	+++ +++	++ ++	++ +++

culation. Pour les deux phénomènes, c'est le troisième jour après l'inoculation des cellules que la lecture est la plus précise dans les conditions de nos expériences.

Pour mettre en évidence l'influence sur le virus grippal des deux virus, p. p. v. et p. p. l., on a procédé ainsi.

Le titrage des deux virus p. p. a été de nouveau effectué, en présence cette fois d'une dilution fixe à 10^{-2} du virus grippal, dilution choisie comme il est dit plus haut.

Parallèlement, on a opéré, d'une part l'inoculation simultanée des cultures de cellules avec les virus à parties égales, et d'autre part l'introduction du virus grippal quarante-huit heures après celle des virus p. p. v. et p. p. l.

RÉSULTATS.

Les résultats sont consignés dans les tableaux I et II.

Comme on peut le voir, l'inoculation des cellules avec les deux souches de virus p. p. inhibe l'action cytopathogène et l'effet

us grippal. Inoculation simultanée en parties égales.

flacons					t é m o i n s																			
ppl	2		3			grippe					p.p.v.					p.p.l.					cellules			
	ppv	ppl	ppv	ppv	ppl	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4
-	-	-	-	-	-																			
+	-	-	-	-	-																			
-	-	-	-	-	-																			
-	-	-	-	-	-	+++	++	++++	+	++														
-	-	-	-	-	-	++	+++	++	+++	+														
+	-	+	-	-	-																			
+	-	+	-	-	-																			
++	+++	+++	++	++	++																			
++	+++	+++	+++	+++	+++																			
+++	+++	++	+++	++	++																			
+++	+++	++	++	++	++																			

hémadsorbant du virus grippal. Cette inhibition est plus marquée pour la souche de p. p. virulente que pour la souche lapinisée. L'effet est plus net lorsque les virus p. p. et le virus grippal sont introduits simultanément que lorsqu'ils sont inoculés à intervalle de quarante-huit heures. Peut-être cette différence est-elle due au vieillissement des cellules dans l'intervalle.

D'autre part la même expérience a été faite sur cellules de rein de veau avec les dilutions suivantes : virus grippal 10^{-2} , p. p. v.

$10^{-1,5}$, p. p. l. $10^{-1,5}$. Notre souche de virus grippal était en effet adaptée à ce type de cellules. Il est intéressant de remarquer que, dans ces conditions, on n'a pas observé l'inhibition de l'effet cyto-

TABLEAU II. — Interférence entre les virus p. p. v. et p. p. l.

date		dilutions p.p.v.-p.p.l.	tubes								
			1 ppv	2 ppl	3 ppv	4 ppl	5 ppv	6 ppl	7 ppv	8 ppl	9 ppv
28-3 30-3	Inoc. 2° inoc.	$10^{-1,5}$									
2-4	lésions hémadSORption		- -	+ +	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
28-3 30-3	Inoc. 2° inoc.	10^{-2}									
2-4	lésions hémadSORption		++ +	++ +++	- -	+ +	+ -	- +	- -	- -	- -
28-3 30-3	Inoc. 2° inoc.	10^{-3}									
2-4	lésions hémadSORption		++ +++	++ +++	+ +	+ +	- -	++ +++	- -	++ +++	- -
28-3 30-3	Inoc. 2° inoc.	10^{-4}									
2-4	lésions hémadSORption		+ +	++ +++	++ +++	+ ++++	+ ++	+ ++++	++ +++	+++ ++++	+ ++
28-3 30-3	Inoc. 2° inoc.	10^{-5}									
2-4	lésions hémadSORption		+++ +++	+++ ++++	++ +++	++ ++++	+++ +++	++ ++	++++ ++++	++++ ++	++ ++

pathogène ni de l'hémadSORption par les virus p. p. v. et p. p. l., ce qui élimine la possibilité que ce soit le tissu de la rate lui-même qui ait inhibé l'action du virus grippal.

RÉSUMÉ.

1° On a étudié la croissance du virus grippal (type A₂) sur cellules de rein de porc de première explantation.

2° Sur les mêmes cellules un essai d'interférence a été tenté entre, d'une part, deux souches de virus de la peste porcine, l'une virulente et l'autre lapinisée, et, d'autre part, le virus grippal. Chacune des deux souches de peste porcine inhibe l'effet cyto-

★ ★

Nous tenons à remercier particulièrement le D^r J. Maurin et les autres membres du Service des Virus pour les conseils et l'aide matérielle qu'ils nous ont apportés dans ce travail. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de notre gratitude.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KUMAGAI (T.), SHIMIZU (T.) et MATUMOTO (M.). *Science*, 1958, **128**, 366.
 - [2] BETZ (A.) et MAURIN (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 224-227.
 - [3] LÉPINE (P.), SLIZÉWICZ (P.), DANIEL (Ph.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 654-656.
 - [4] VOGEL (J.) et SHELOKOV (A.). *Science*, 1957, **126**, 358-359.
-

ÉTUDE DE L'ACTION DE LA MICROFLORE DES SOLS SUR DIFFÉRENTS SUBSTRATS

I. PRINCIPES ET DESCRIPTION DES TECHNIQUES

par R. MOREAU (*), M. JACOB (*) et J. AUGIER (**) (***).

On sait maintenant que, *in vitro*, le taux de croissance des espèces microbiennes du sol est d'autant plus petit que chacune d'elles y est représentée par un plus grand nombre d'individus : Augier [1] l'a montré récemment. Connaître la variation de ces taux de croissance en fonction du nombre de microorganismes de chaque espèce apporterait une information précieuse pour la compréhension des mécanismes de l'équilibre biologique des sols. Pour cela, J. Augier a proposé une méthode générale, dont deux exemples détaillés ont été donnés précédemment, à propos de la dégradation par la microflore des sols, des hémicelluloses [2] et de l'amidon [3].

A. — PRINCIPES.

Le principe de la méthode consiste à préparer des dilutions — suspensions de terre — seul moyen permettant ensuite de calculer le nombre des microorganismes présents, puis à les ensemercer dans un milieu sélectif. On cherche alors à déterminer le moment où la culture commence à s'accroître rapidement : c'est le début de la phase exponentielle de croissance, puis celui où la culture est près de l'avoir terminée ; fin de la phase exponentielle de croissance. Plus le temps écoulé est long entre le début et la fin de la croissance, plus le taux de cette dernière est petit. En déterminant le taux de croissance des germes pour chaque dilution on arrivera évidemment à préciser son mode de variation. Les résultats sont traduisibles graphiquement et la courbe obtenue est nommée *différentielle* [1].

(*) Laboratoire de Botanique et Laboratoire de Chimie de l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie de Besançon.

(**) Institut Pasteur, Paris.

(***) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juillet 1960.

La méthode générale, donnée antérieurement, consiste donc dans son principe à déterminer le début de la croissance par la mise en évidence d'une modification chimique du milieu qui soit très précocement décelable : par exemple, apparition de nitrites dans l'amylolyse, ou encore d'ammoniaque libre pour les ammonifiants, etc. La fin de la croissance sera marquée par la disparition ou la très forte diminution, suivie à l'aide d'un test simple, de la source d'énergie ou d'un autre métabolite qui suit la même loi de disparition qu'elle. Par exemple on notera la disparition des nitrates du milieu lorsque cette dernière est proportionnelle à celle de la source d'énergie. La courbe de croissance des bactéries est bien donnée par la courbe de disparition du substrat. En effet, le rapport entre la quantité de substance vivante produite et la quantité de substrat consommée est constant, quel que soit le taux de croissance [5].

Pour choisir convenablement les tests qui permettent de déterminer le début et la fin de la croissance des germes, il faut, bien entendu, suivre l'évolution de la composition du milieu, en fonction du temps et de la croissance des bactéries. Nous avons donc cherché à mettre au point un dispositif expérimental et un ensemble de méthodes de dosage permettant pour chaque dilution de suivre le dégagement de gaz carbonique par la culture, de tracer la courbe de disparition du substrat et celle de la source azotée, la courbe d'apparition (et s'il y a lieu de disparition) des divers métabolites, tels que nitrites ou ammoniaque par exemple. L'ensemble permettra d'étudier l'action de la microflore des sols sur un substrat et une source d'azote quelconques [4]. Dans cette note, nous décrirons donc son caractère de généralité. Les mémoires suivants seront consacrés à l'étude du métabolisme de divers substrats et de différentes sources azotées.

Ajoutons qu'il est également possible de faire la numération des germes présents, en fonction du temps. Mais cette détermination est moins précise que l'étude de la disparition du substrat, puisque la taille des germes n'est pas rigoureusement constante au cours de la croissance et aussi parce que les germes morts représentent de la matière vivante *qui a été produite*.

B. — L'APPAREILLAGE.

Notre dispositif expérimental est représenté par la figure 1. Il se compose au maximum de neuf à dix flacons de culture dont le volume est voisin d'un litre chacun. Le nombre varie avec les terres à étudier. Le bouchon de caoutchouc obturant chacune des fioles est traversé par trois tubes :

L'un plonge dans le milieu de culture. Ce tube, branché sur une

arrivée d'air privé de CO_2 , assurera l'oxygénation du liquide par simple barbotage.

Un autre tube, de diamètre plus large, permettra de réaliser les prélèvements de façon aseptique.

Le troisième enfin, assure la sortie de l'air. Il sera relié ou non à un flacon barboteur, rempli d'eau de baryte, et qui permettra le dosage éventuel du CO_2 dégagé par la culture.

Ces trois tubes sont bouchés au coton. Sur le tube à prélèvements enfin, on adapte un bouchon muni d'un petit manomètre : ainsi, on réalisera des pressions égales dans chaque flacon d'expérience.

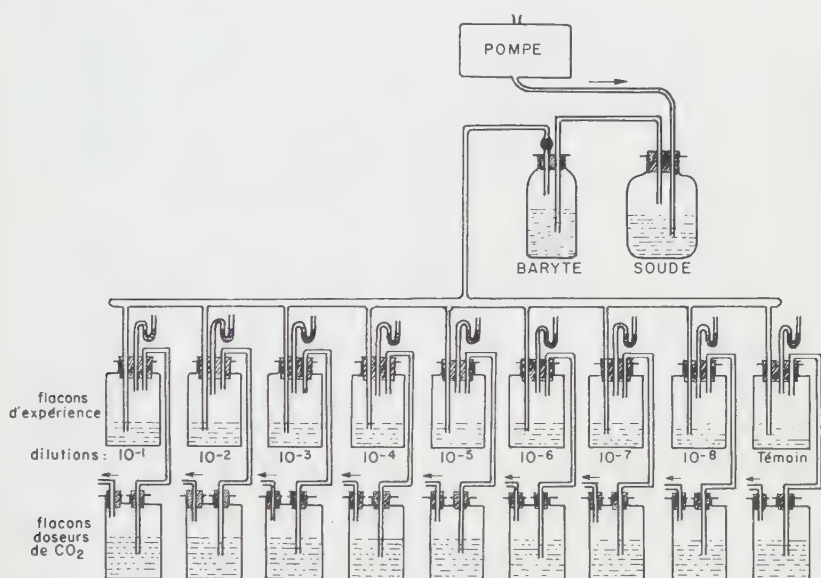


FIG. 1.

Des robinets de verre ou des pinces de Mohr placées en amont des flacons permettront de procéder facilement à ce réglage.

Chaque flacon de culture, après remplissage, est soigneusement fermé à l'aide du bouchon correspondant à trois tubulures, puis il est autoclavé tel quel. Il ne sera pas ouvert de toute l'expérience. On procédera seulement aux prélèvements, avec les précautions d'usage, par le tube prévu à cet effet.

Après ensemencement, les flacons sont disposés dans l'étuve et alimentés d'air en parallèle. L'aération est réalisée à l'aide d'une petite pompe. L'air passe d'abord dans de la potasse concentrée,

puis barbote dans de l'eau de baryte additionnées l'une et l'autre d'un indicateur (phénolphthaléine). Le CO_2 est ainsi convenablement fixé. Nous employons d'ailleurs des plaques en verre fritté, et non des tubes simples, pour effectuer le barbotage de l'air. On obtient ainsi un brassage très important qui permet de réduire le nombre de flacons-laveurs utilisés.

Nous avons renoncé, du moins pour l'instant, à employer un mélange d'oxygène et d'azote sous pression.

C. — LES MILIEUX DE CULTURE.

Comme nous l'avons vu plus haut, l'un des principes de notre méthode consiste à utiliser des milieux sélectifs, adaptés chacun à l'étude d'une fonction physiologique ou d'un groupe déterminés de germes du sol. Nous n'indiquerons pas ici les caractères généraux et communs de ces milieux dont la description détaillée sera donnée dans nos publications ultérieures concernant l'étude de divers métabolites : amidon, cellulose, amino-acides, phénols, etc.

Chaque milieu a pour base une solution de sels minéraux très purs, à laquelle on ajoute une petite quantité (1 ml généralement) d'une solution de micro-éléments [6] et quelques millilitres d'extrait de terre qui apporte des facteurs de croissance nécessaires aux microorganismes. La dose d'extrait (3 ml par litre) a été calculée de telle sorte qu'elle ne crée aucune perturbation sensible en quantité suffisante pour nuire à l'électivité du milieu. Nous l'avons montré à propos d'une nouvelle méthode de l'amylolyse [3].

La substance dont nous désirons étudier le métabolisme est ajoutée en quantité calculée, de telle façon que le rapport C/N du milieu soit voisin de 15. Dans certains cas nous en faisons varier cette valeur ; c'est le cas, par exemple, du travail que nous préparons actuellement sur les phénomènes de l'ammonification en utilisant une série d'amino-acides et en faisant varier systématiquement le rapport C/N des milieux.

D. — LES MÉTHODES DE DOSAGE.

Nous ne décrivons dans ce mémoire que les techniques que nous utilisons couramment, comme celles du dosage des nitrites et des nitrates, de l'anhydride carbonique, ainsi que celles du glucose dont l'étude du métabolisme nous servira d'exemple dans la deuxième partie de ce travail. On remarquera que nous utilisons très généralement des micro-dosages colorimétriques ou turbidimétriques (CO_2), qui se prêtent facilement aux dosages en série. C'est dans nos mémoires ultérieurs que nous décrivons les méthodes utilisées pour les dosages des substrats étudiés.

1° DOSAGE DES NITRITES. — Nous employons la méthode colorimétrique basée sur la réaction de Griess [7].

Réactifs : a) Solution étalon de nitrite de sodium P. A. La solution se conserve bien après addition de 1 ml de chloroforme et de 100 mg de soude par litre.

b) Acide sulfanilique à 0,6 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 2,4 N (1/5).

c) α -naphtylamine incolore : 0,6 g + 1 ml d'acide chlorhydrique concentré + 100 ml d'eau.

d) Acétate de sodium cristallisé en solution à 25 p. 100 (2 M).

Mode opératoire. A la prise d'essai, on ajoute 1 ml d'acide sulfanilique. On attend trois à quatre minutes et l'on ajoute 1 ml d' α -naphtylamine, puis 1 ml d'acétate (pH de l'ensemble : 2 à 2,5). On amène à 50 ml. On laisse reposer dix minutes. On dose par colorimétrie (à 580 m μ) par rapport à une gamme étalon établie dans les mêmes conditions.

2° DOSAGE DE L'ENSEMBLE NITRATES-NITRITES. — Au cours de nos recherches sur le métabolisme des substances glucidiques, nous avons noté que la formation d'acide nitreux est constante, mais semble être irrégulière du fait peut-être d'autres composés azotés du type acide hyponitreux qui peuvent prendre naissance à côté ou à partir de lui, en proportions variables. Un test à la fois sûr et intéressant serait de suivre la disparition des nitrates du milieu. Nous avons d'ailleurs vu plus haut que cette recherche est d'un intérêt certain lorsque l'on est sûr que leur loi de disparition est parallèle à celle du substrat étudié.

Là encore nous avons utilisé une méthode relativement simple, spécifique, assez sensible et se prêtant à un travail en série. Il s'agit de la méthode de Lemoigne, Monguillon et Desveaux [8]. Le principe en est le suivant : on réduit les nitrates par le zinc, puis on oxyde les composés voisins qui ont pu se former par action de l'iode en solution acétique : tous sont transformés en acide nitreux. On dose ensuite ce dernier par colorimétrie en utilisant la réaction de Griess. Les réactifs utilisés sont ceux de Blom.

Réactifs. — a) Sulfate d'ammonium P. A. Zinc pur.

b) Acide sulfanilique : 10,5 g d'acide et 7 g d'acétate de sodium sont dissous dans 300 ml d'acide acétique cristallisable additionnés de 600 ml d'eau distillée. On chauffe trois minutes à ébullition. Après refroidissement on amène au litre.

c) α -naphtylamine : on ajoute 5 g d' α -naphtylamine à 1 l d'eau bouillante. Ebullition de cinq minutes. On filtre. On ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique concentré. Après refroidissement on amène au litre.

d) Iode en solution à 1,3 p. 100 dans l'acide acétique cristallisable.

e) Thiosulfate de sodium : solution à 2,5 p. 100 dans l'eau distillée.

Mode opératoire. — Le prélèvement de 1 ml, dans chaque flacon d'expérience, est amené à 20 ml. 10 ml de cette solution sont ajustés à un pH de 2 à 3,5 par addition de 1 g de sulfate d'ammonium. On amène à 20 ml. On refroidit ensuite dans la glace fondante et l'on ajoute un fragment de zinc (environ 1 g). [Nous avons remarqué que la réduction ne se fait bien que lorsque l'on ajoute des traces de chlorure de platine]. On agite, tout en maintenant trois minutes dans la glace. Au bout de ce temps on sépare le zinc, puis l'on prélève 10 ml de la solution qui sont placés dans une fiole jaugée de 50 ml. On ajoute 1 ml de la solution d'acide sulfanilique et 1 ml de celle d'iode acétique. On laisse trois minutes, puis l'iode est éliminé par Q. S. de thiosulfate. On ajoute alors 1 ml de solution de naphtylamine et l'on amène à 50 ml. On laisse vingt minutes, puis on effectue la lecture au photolorimètre.

D'après les auteurs, avec des solutions contenant 0,14 mg à 1,4 mg d'azote nitrique par litre, l'approximation est de ± 3 p. 100. Pour une recherche qualitative, en partant de 20 ml, on peut déceler 0,01 mg d'azote nitrique par litre. Cette méthode est donc très largement suffisante pour suivre la disparition des nitrates du milieu. La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution stock de nitrate de potassium à 1 g par litre.

On peut utiliser également la méthode par réduction des nitrates et des nitrites au moyen de l'alliage de Dewarda. On distille ensuite l'ammoniac formé en le déplaçant par la magnésie calcinée ; on le reçoit dans une solution d'acide borique, ce qui évite des pertes, et l'on dose par l'acide sulfurique N/20 ou N/50. Lorsque l'on emploie cette méthode, on doit évidemment doser l'ammoniac présent s'il y en a. Dans les deux cas, on calcule la quantité de nitrates par différence.

3° DOSAGE DE L'ANHYDRIDE CARBONIQUE. — Nous avons mis au point (Jacob [9]) une méthode basée sur la fixation de l'anhydride carbonique par l'eau de baryte, en nous inspirant d'un procédé de Kohn-Abrest [10] qui convient au dosage de l'anhydride carbonique, qu'il soit libre ou combiné dans une solution. En effet, dans certaines conditions, l'eau de baryte absorbe intégralement le CO_2 , par simple barbotage dans un flacon de Kloeze, par exemple. Dans ce système hétérogène, l'intensité du trouble dû au carbonate formé est proportionnelle, dans certaines limites, à la quantité d'anhydride carbonique fixée ; on peut donc doser

ce dernier par turbidimétrie du carbonate de baryum. D'après Lasieur [11] la fixation du CO_2 dans la baryte constitue une méthode de dosage très sûre.

Réactif. L'eau de baryte est préparée suivant la méthode indiquée par Mathieu [12], et par ce moyen elle est stable pendant trois ou quatre mois.

On évite toute carbonatation en conservant cette eau de baryte dans un flacon à remplissage automatique. Le titre demeure invariable pendant très longtemps.

Mode opératoire : Etalonnage. Comme il est difficile de préparer deux solutions de baryte ayant même titre, on doit refaire un étalonnage pour chaque fabrication nouvelle de réactif. Dans une série de flacons, on mesure pour chacun 10 ml d'eau de baryte et 10 ml d'eau distillée (privée de CO_2). On ajoute alors des quantités croissantes d'anhydride carbonique, sous forme d'une solution titrée de carbonate de sodium. On agite légèrement au moment de la mesure au photocolorimètre.

Dosage. Comme nous l'avons vu plus haut, à la sortie de chaque flacon d'expérience, on commute un Kloeze contenant 10 ml d'eau de baryte et 10 ml d'eau distillée, privée de CO_2 . Le dosage se fait ensuite au photocolorimètre, entre 520 et 560 m μ . Les dosages doivent être assez fréquents pour que l'on se trouve dans la partie centrale de la courbe d'étalonnage. On peut éventuellement diluer, si le précipité est trop important.

4° DOSAGE DU GLUCOSE. — Nous utilisons la méthode, adaptée de King et Garner, du microdosage du glucose dans le sang et le liquide céphalo-rachidien.

Réactifs.

- a) Sol. de sulfate de sodium $10 \text{ H}_2\text{O}$ à 3 p. 100 .. 320 ml
Sol. de sulfate de cuivre $5\text{H}_2\text{O}$ à 7 p. 100 30 ml
- b) Tungstate de sodium, solution aqueuse à 10 p. 100.

(Ces deux réactifs servent à la défécation).

c) Réactif cuprique :

Solution A :

Sulfate de cuivre $5\text{H}_2\text{O}$ solution aqueuse à	
13 g/1 000 ml	50 g

Solution B :

Carbonate de sodium anhydre	40 g
Eau distillée	700 ml

On fait dissoudre et on ajoute une solution de 36,8 g d'oxalate de potassium dissous à 60° C dans 120 ml d'eau distillée ; on ajoute :

Tartrate de sodium et de potassium	24 g
Eau distillée	100 ml

On verse le tout dans une fiole jaugée de 1 000 ml et on complète.

Le réactif cuprique *c* se prépare au moment de l'emploi, par mélange, en parties égales, des solutions A et B.

d) Réactif arséno-molybdique :

Molybdate d'ammonium	25 g
Eau distillée	450 g

On dissout à chaud. Après refroidissement, on ajoute 21 ml d'acide sulfurique concentré PA, puis une solution faite en dissolvant 3 g d'arséniate acide de sodium $7\text{H}_2\text{O}$, dans 21 ml d'eau distillée. On mélange et on laisse à l'étuve à 37° C, pendant vingt-quatre à quarante-huit heures. On conserve en flacon émeri brun.

Solution étalon de glucose :

Glucose anhydre pur	1 g
Sol. aqueuse saturée d'acide benzoïque q.s.p...	1 000 ml
1 ml de cette solution = 1 000 µg de glucose.	

Conserver à la glacière. Au moment de l'emploi on dilue au 1/10 dans Q. S. d'une solution saturée d'acide benzoïque, et l'on réalise une gamme que l'on traite comme ci-dessous.

Mode opératoire. — 1 ml de liquide de culture est dilué à 100 ml. On prélève de nouveau 1 ml de cette solution pour le dosage. Au préalable, s'il en est besoin (culture importante), on aura déféqué en ajoutant au prélèvement une certaine quantité de réactif *a* puis de *b*, et en centrifugeant ensuite. Mais souvent, cela n'est pas nécessaire. On rince les bords du tube avec quelques gouttes d'eau distillée, puis on ajoute 1 ml du réactif cuprique *c*. On laisse au bain-marie bouillant pendant dix minutes. On retire ensuite les tubes que l'on plonge dans l'eau froide, cinq minutes. On ajoute alors 1 ml de réactif arséno-molybdique. On agite, puis l'on complète à 10 ml avec de l'eau distillée. La coloration apparaît rapidement ; de plus elle est stable.

La colorimétrie se fait en cuve de 1 cm avec filtre rouge (630 mµ). Lectures en transmission.

E. — EXEMPLE DE PRINCIPE : DÉGRADATION DU GLUCOSE.

Nous avons choisi le glucose comme exemple théorique, en raison de sa facilité d'emploi et de dosage, bien que cette sub-

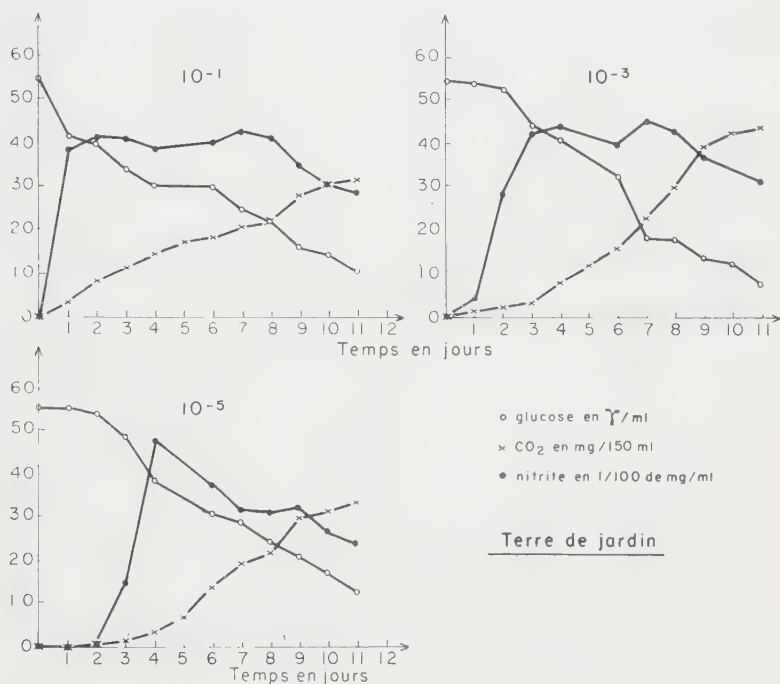


FIG. 2.

stance ne présente qu'un intérêt mineur dans le métabolisme des sols.

Le milieu utilisé est ainsi composé :

Glucose	5,5 g
Hydrogéo-phosphate de potassium	0,5 g
Nitrate de potassium	1 g
Solution de micro-éléments	1 ml
Extrait de terre standard	3 ml
Eau distillée q. s. p.	1 000 ml

Le pH est ajusté à 7 environ. On répartit le milieu dans les fioles, à raison de 150 ml chacune. On stérilise vingt minutes à 112° C.

On ensemence ensuite chaque fiole avec 10 ml de suspension-dilution de terre. Les fioles sont mises en place. Chaque jour et pour chaque dilution, on dose le CO₂ dégagé, les nitrites, les nitrates et le glucose présents. Les résultats sont ensuite reportés sur des graphiques, avec en abscisses le nombre de jours et en ordonnées les résultats des dosages. Les quantités d'anhydride carbonique dégagé sont cumulées jour par jour.

Nous avons étudié de cette façon, une terre de jardin et une terre forestière [terre de sapinière, Vercel (Doubs)]. Sur la figure 2 sont représentées trois de ces courbes obtenues avec la première : il s'agit des dilutions 10⁻¹, 10⁻³ et 10⁻⁵.

Ces courbes montrent d'abord que l'apparition des nitrites coïncide très exactement avec le début de la disparition du glucose. On voit aussi que leur quantité augmente très rapidement dès le début de l'expérience. Cela confirme donc que la recherche qualitative des nitrites constitue un test très sûr pour marquer le début de l'attaque de la source carbonée, lorsque l'on emploie les techniques dites « en différentielles ».

On constate également que la courbe de dégagement du CO₂ ne peut servir à déterminer, même approximativement, le taux de croissance des germes, pour chaque dilution. En effet, le dégagement d'anhydride carbonique par les cultures dépend du coefficient respiratoire des germes. De par l'effet de ségrégation qui intervient entre les microorganismes, du fait des dilutions, ce ne sont pas forcément les mêmes espèces qui interviennent dans chaque fiole d'expérience. On remarque cependant que les courbes sont assez régulières dans leur ensemble, ce qui montre que le métabolisme du glucose se fait régulièrement. Il ne faut pas oublier non plus que la courbe obtenue est la résultante des actions de la flore catabolique proprement dite, mais aussi des microflores associées qui utilisent les produits de métabolisme de la première.

La courbe de disparition du glucose est beaucoup moins régulière, sans doute à cause de la présence de produits de métabolisme réducteurs eux aussi. Il n'en reste pas moins, qu'en dehors de certains « plateaux » plus prononcés encore dans le deuxième exemple (fig. 3), on peut facilement extrapoler et tracer des droites. Ces courbes paraissent beaucoup plus représentatives du taux de croissance des germes que les précédentes. La figure 2 montre que, pour la terre étudiée, le taux de croissance est sensiblement le même à chaque dilution.

L'examen de la figure 3 montre que cette dernière remarque n'est évidemment pas générale. Pour cette terre forestière, le glucose est dégradé assez régulièrement et rapidement à la première dilution. Il en est de même aux troisième et quatrième dilutions, mais après un temps de latence normal, la pente est moins raide, signe d'un taux de croissance des germes inférieur. Aux deuxième

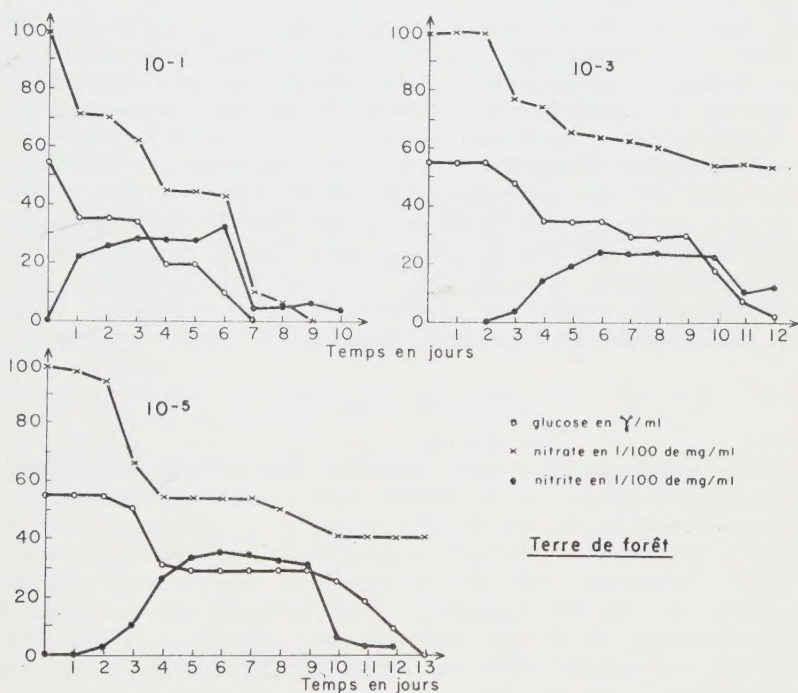


FIG. 3.

et cinquième dilutions, on remarque un curieux plateau, qui se révèle après plusieurs jours d'expérience, après quoi le glucose est de nouveau métabolisé très rapidement.

En ce qui concerne les nitrates, on s'aperçoit que, dans l'ensemble, leur courbe de disparition suit celle du glucose, du moins avec les terres utilisées. Il est intéressant de noter également qu'aux dilutions 2 et 5 de la terre forestière, aux plateaux du glucose correspondent des plateaux pour les nitrates. De plus, le métabolisme du sucre reprend, mais les nitrates ne semblent

plus attaqués. Par contre, les nitrites disparaissent très vite. On peut alors se demander si ces dilutions ne forment pas la frontière entre deux flores dont l'une prend le relais de l'autre pour la destruction du glucose, mais dont la source d'azote préférentielle est constituée par les nitrites et non plus les nitrates.

Il n'est pas sans intérêt enfin de souligner que la ségrégation au fil des dilutions, dont nous avons parlé maintes fois, n'est pas une vue de l'esprit. Nous avons suivi régulièrement l'évolution de la population microbienne des divers flacons en préparant des lames, fixées et colorées à la fuchsine, que nous avons examinées au microscope. Pour la terre forestière par exemple, on constate que les premiers flacons contiennent presque uniquement de grosses bactéries sporulées, alors que les derniers ne montrent presque exclusivement que de très petites bactéries coccoïdes, qui sont donc les plus nombreuses dans le sol et dont on peut penser qu'elles constituent une partie de la flore autochtone. Les flacons intermédiaires contiennent ces diverses formes en mélange. Il serait intéressant d'étudier les caractères nutritionnels et biochimiques des germes qui apparaissent à chaque dilution. Nous ne manquerons pas de le faire dans la suite de nos recherches.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION.

Dans cette note les auteurs décrivent leur méthode qui permet, par des cultures en milieu liquide aéré et agitéensemencé par des dilutions-suspensions de terre, de suivre pour chaque fiole, la courbe de disparition de la source carbonée, celle du dégagement du gaz carbonique, celle de la disparition de la source d'azote (nitrates) et celle de l'apparition et de la disparition des nitrites. Les méthodes de dosage utilisées sont décrites en détail. Un exemple concret est donné en prenant comme source de carbone le glucose. Dans des notes suivantes, d'autres exemples seront analysés. Le but de cette note et des suivantes est de permettre de déterminer les limites et les conditions de réalisation des méthodes d'analyses des terres à l'aide des techniques dites « en différentielle ».

SUMMARY

STUDIES ON SOIL MICROFLORA GROWN ON VARIOUS MEDIA.

I. PRINCIPLES AND TECHNIQUES.

Liquid, aerated and agitated media are inoculated with soil dilutions-suspensions. The technique described allows to study the following curves : disappearance of carbon source, production

of CO₂, disappearance of nitrogen source (nitrates), appearance and disappearance of nitrites.

The methods used are described in detail.

An example is given with glucose as a source of carbon. Other examples will be given in further papers.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Past.*, 1959, **96**, 217.
 - [2] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Past.*, 1956, **90**, 161 et 637 ; **91**, 369.
 - [3] AUGIER (J.) et MOREAU (R.) *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 131.
 - [4] AUGIER (J.), MOREAU (R.) et JACOB (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **249**, 1157.
 - [5] MONOD (J.). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Hermann et C^{ie}, Paris, 1942.
 - [6] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 759.
 - [7] CHARLOT (G.) et GAUGUIN. *Dosages colorimétriques. Principes et méthodes*. Masson, édit., Paris, 1952.
 - [8] LEMOIGNE (M.), MONGUILLON (P.) et DESVEAUX (R.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, 841.
 - [9] JACOB (M.). *Ann. Sci. Université Besançon, Médec. et Pharmac.*, (à paraître).
 - [10] KOHN-ABREST. *C. R. Acad. Sci.*, 1919, **168**, 1019 ; *Rev. chim. ind.*, 1937, **46**, 2, 40 et 66.
 - [11] LASIEUR (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1938, **206**, 606.
 - [12] MATHIEU (A.). *Analyse chimique volumétrique*. Masson, édit., Paris, 1942.
-

LIVRES REÇUS

Staining procedures. 2^e édit., 1 vol., 289 p., The Williams and Wilkins Company, édit., Baltimore, 1960. Prix : 5 \$.

La Commission des Colorations Biologiques a réuni dans un même catalogue les meilleures techniques de coloration en usage actuellement. Cette deuxième édition traite des colorations histologiques utilisées aussi bien en biologie animale, qu'en biologie végétale et termine par un exposé de technique propre à la microbiologie.

Chaque coloration est exposée d'après un même plan : son but, la préparation des colorants, la technique proprement dite, les résultats qu'on peut en attendre. En fin d'ouvrage on a en outre la bibliographie correspondante.

Ce livre uniquement technique sera de manipulation facile au laboratoire. J.-C. L.

K. A. Biset et G. H. G. Davis. — *The microbial flora of the mouth*. 1 vol., 100 p., Heywood and Co LTD, Londres, 1960. Prix : 22 s. 6 d.

Ce petit livre, très élémentaire, donne des notions fort succinctes sur la microflore buccale et n'a pas d'autres prétentions que d'initier les débutants à ce sujet. En voici la division : Préface ; Nature et Systématique de la microflore buccale ; Méthodes d'étude ; *Actinomyces* ; *Leptotrichia* ; *Fusobacterium* et *Bacteroides* ; *Corynebacterium* et *Nocardia* ; *Lactobacillus* ; *Streptococcus* ; *Staphylococcus* et *Micrococcus* ; *Neisseria* et *Veillonella* ; *Bacillus* ; Tréponèmes buccaux ; *Seelenomonas* ; *Candida* ; Microflore buccale en rapport avec les maladies infectieuses. A.-R. P.

M. Florkin. — *Naissance et déviation de la théorie cellulaire dans l'œuvre de Theodore Schwann*. 1 vol., 232 p., Hermann, édit., Paris, 1960.

Tous ceux qui s'intéressent à la biologie ne pourront qu'être heureux de lire cet ouvrage, qui est à la fois un récit historique et un essai sur la théorie cellulaire.

Notre collègue Marcel Florkin a fait là non seulement œuvre de savant, mais aussi de psychologue et d'écrivain.

Il retiendra tous ceux qui s'interrogent sur les obscurs procédés de l'invention scientifique, et plus largement tous ceux que ne laisse pas indifférents le drame d'une conscience humaine, comme le dit Jean Rostand dans son introduction. J.-C. L.

A. Baker, R. L. Davies et F. Sivadon. — *Services psychiatriques et Architecture. Organisation Mondiale de la Santé : Cahiers de santé publique*, 1960, n° 1 ; 65 p. Prix : Fr. s. 2,- -, 2/6 ou \$ 0,60. Publié également en anglais (Dépositaire pour la France: Librairie Masson, Paris).

Printed in France.

Le Gérant : G. MASSON.